

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Marina Smetiško

Utjecaj dušikovih spojeva na fotosintetske pokazatelja u lišaja
Flavoparmelia caperata

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije

Zahvale:

Velika hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec na ogromnom razumijevanju i strpljenju. Hvala Vam na pomoći prilikom provedbe i pisanja diplomskog rada.

Također, hvala Mariji što je prikupila uzorke i time omogućila ovo istraživanje.

Hvala Kristini, Katarini, Ines na svim riječima podrške, pomoći i strpljenju tijekom ovih nezaboravnih pet godina. Hvala i svim ostalim prijateljima na vremenu kojem smo proveli zajedno.

Najveća hvala mojim roditeljima, sestri i braći koji su uvijek bili tu uz mene. Hvala što ste vjerovali u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj dušikovih spojeva na fotosintetske pokazatelja u lišaja

Flavoparmelia caperata

Marina Smetiško

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lišaji su dobri bioindikatori kvalitete zraka pa ih se u zadnje vrijeme često koristi za praćenje emisije amonijaka i dušikovih oksida. Cilj ovog istraživanja je bio odrediti osjetljivost vrste *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale na povećanu količinu dušika u obliku amonijevih i nitratnih iona te utvrditi utječe li intenzitet svjetla na učinak dušika. Uzorke lišaja sam tretirala uranjanjem u 1 mol dm⁻³ otopinu kalijeva nitrata, 1 mol dm⁻³ otopinu amonijeva nitrata te 0,5 mol dm⁻³ otopinu amonijeva sulfata u trajanju od 30 minuta. Dio uzoraka izlagala sam jačem intenzitetu osvjetljenja (100 μE m⁻² s⁻¹), a dio slabijem intenzitetu (40 μE m⁻² s⁻¹). Utjecaj dušika analizirala sam mjerenjem pokazatelja fluorescencije klorofila *a in vivo*, udjela fotosintetskih pigmenata te kvocijenta feofitinizacije nakon 3., 7. i 14. dana tretmana. Tretiranje amonijevim nitratom uzrokovalo je sniženje maksimalnog prinosa fotosustava II, sniženje udjela klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida te sniženje kvocijenta feofitinizacije što ukazuje na negativan učinak ovog spoja na proces fotosinteze i degradaciju klorofila. Tretiranje amonijevim sulfatom uzrokovalo je povećanje udjela karotenoida 7. dana nakon tretmana te sniženje udjela klorofila *b* nakon 14. dana. Tretman kalijevim nitratom uglavnom nije uzrokovao značajnije promjene. Intenzitet svjetla nije značajnije utjecao na učinak dušikovih spojeva. Na temelju rezultata može se zaključiti da je ova vrsta osjetljiva na povećanu količinu dušikovih spojeva ali onih koji sadrže amonijeve ione, osobito amonijev nitrat.

(44 stranice, 11 slika, 36 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Flavoparmelia caperata*, lišaji, dušik, pigmenti, fotosinteza

Voditelj: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Ocjenitelj: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.,
Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.,
Dr. sc. Marina Cindrić, prof.

Rad prihvaćen: 14.9. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The effect of nitrogen compounds on photosynthetic parameters in lichen

Flavoparmelia caperata

Marina Smetiško
Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lichens are good bioindicators of air pollution so recently they are being used for tracking emission of the ammonium and nitrogen oxide. Purpose of this research was to determine sensitivity of the species *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale to higher amount of nitrogen compounds and to find if intensity of light can influence the effect of the nitrogen. Lichen samples were incubated in 1 mol dm⁻³ solutions of potassium nitrate or ammonium nitrate, or 0.5 mol dm⁻³ solution of ammonium sulfate for 30 minutes. Part of the samples was exposed to higher intensity of light (100 µE m⁻² s⁻¹), and another one to lower intensity of light (40 µE m⁻² s⁻¹). Nitrogen effects were analyzed by the chlorophyll *a* fluorescence, content of photosynthetic pigments and phaeophytinization quotient 3th, 7th and 14th day after the treatment. Ammonium nitrate treatment decreased maximum quantum yield, content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids and also caused lowering of the phaeophytinization quotient indicating the negative effect of this compound on the photosynthesis process and chlorophyll degradation. Ammonium sulfate treatment increased the content of the total carotenoids 7th day after treatment and decreased the content of chlorophyll *b* 14th day after treatment. Potassium nitrate treatment did not cause any significant changes. Intensity of light did not statistically significant influence the effect of the nitrogen compounds. Based on the results, it could be concluded that *Flavoparmelia caperata* is sensible to higher amount of nitrogen compounds, but the ones that contain ammonium ions, especially ammonium nitrate.

(44 pages, 11 figures, 36 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Supervisor: Dr. sc. Mirta Tkalec, Assoc. Prof.

Key words: *Flavoparmelia caperata*, lichens, nitrogen, pigments, photosynthesis

Reviewers: Dr. sc. Mirta Tkalec, Assoc Prof.,
Dr. sc. Ines Radanović, Assoc Prof.,
Dr. sc. Marina Cindrić, Prof.

Thesis accepted: September 14, 2017.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Lišaji	1
1.2. Lišaji kao bioindikatori onečišćenja.....	2
1.3. Učinak dušikovih spojeva na lišajeve	3
1.4. Fotosinteza	4
1.4.1 Čimbenici koji utječu na fotosintezu	5
1.4.2. Fluorescencija klorofila a.....	6
1.5. Istraživana vrsta	8
1.6. Cilj istraživanja	9
2. Materijal i metode	10
2.1. Materijal	10
2.2. Metode	10
2.2.1. Priprema otopina	10
2.2.2. Tretiranje otopinama	10
2.2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila a.....	11
2.2.4. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	12
2.2.5. Obrada podataka	12
3. Rezultati	13
3.1. Fluorescencija klorofila a	13
3.1.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II.....	13
3.1.2. Efektivni prinos fotosustava II na svjetlu.....	15
3.1.3. Koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije	17
3.1.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije	19
3.2. Fotosintetski pigmenti	22
3.2.1. Maseni udio klorofila a.....	22
3.2.2. Maseni udio klorofila b	24
3.2.3. Maseni udio ukupnih karotenoida	27
3.2.4. Kvocijent feofitnizacije	30
4. Rasprava	33
5. Zaključak	40
6. Literatura	41
7. Životopis	44

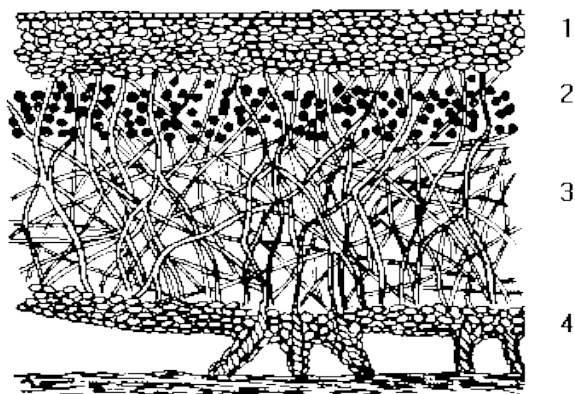
1. Uvod

1.1. Lišaji

Lišaji su simbiotska zajednica najmanje dva organizma, fotobionta i mikobionta. Na mjesto fotobionta najčešće dolaze ili cijanobakterije ili zelene alge, a na mjesto mikobionta gljive iz razreda Arthoniomycetes, Dothideomycetes i Eurotiomycetes. Odnos fotobionta i mikobionta je mutualistički. Fotobionti vrše fotosintezu i opskrbljuju mikobionta ugljikohidratima dok mikobiont apsorbira vodu i nutrijente iz podloge te štiti fotobiont od ekstremnih temperatura te svjetla jakog intenziteta.

Lišaji su svrstani u carstvo gljiva. Procjenjuje se da ih ima između 13 500 – 17 000 različitih vrsta (Nash 2008). Lišaji pokazuju velike varijacije u izgledu. Prema obliku najčešće se dijele na listaste, grmaste, koraste i galertaste. Razlikuju se i po boji. Može se ih naći u narančastoj boji, žutoj, crvenoj, zelenoj, sivoj, smeđoj i crnoj boji. Također, variraju i u veličini. Mogu biti dugački od nekoliko milimetara pa do dva metra (Nash 2008). Zbog mutualističkog načina života ove organizme možemo naći na gotovo svim područjima Zemljine površine, izloženim visokim temperaturama, niskim temperaturama, suši, poplavi (Nimis i sur. 2000). Lišaji mogu živjeti na različitim podlogama. Većina vrsta žive kao epifiti na drveću i drugim biljkama, a manji broj vrsta na stijenama ili zemlji.

Anatomija lišaja je poprilično jednostavna. Građeni su od četiri sloja (Slika 1). Na površini se nalaze gljive i njihove hife koje isprepletene tvore tkivo plektenhim (sloj 1 na slici 1). Ispod ovog sloja dolazi takozvani gonodijalni sloj u kojem se nalaze alge (sloj 2 na slici 1). U ovaj sloj ulaze hife gljiva s površine i crpe ugljikohidrate koje su alge proizvele. Treći sloj čini mreža hifa i gljiva (sloj 3 na slici 1). Četvrti sloj je građen od hifa gljiva (sloj 4 na slici 1). Zadnji sloj sadrži i rizoide kojima se lišaji pričvršćuju na podlogu (Nash 2008).



Slika 1 Građa lišaja: 1 - površinski sloj plektenhima, 2 – gonodijalni sloj, 3 – mreža hifa i gljiva, 4 – hife gljiva. Preuzeto i prilagođeno prema: <http://www.buffelskloof.info/Lichens.htm>

1.2. Lišaji kao bioindikatori onečišćenja

Kako lišaji nemaju vaskularni sustav za provođenje vode i minerala razvili su poseban mehanizam za uzimanje vode, u obliku magle i rose, i nutrijenata iz atmosfere. Zbog nedostatka kutikule i puči, cijelom površinom talusa apsorbiraju iz zraka za život potrebne nutrijente i vodu (Carter i sur. 2017). U današnje vrijeme, kada je jako razvijena industrija, poljoprivreda te povećani promet, zrak sadrži velike količine onečišćivača koje onda lišaji također apsorbiraju.

Lišaji iz zraka apsorbiraju teške metale poput kadmija, olova, žive, arsena, kositra, te nemetale kao što su sumpor, dušik, hidrogen fluoridi, oksidi i dr. Kako su lišaji dugoživi organizmi koji ne odbacuju svoje dijelove tijekom sezone, onečišćenja se akumuliraju u talusu te izazivaju promjene u fiziologiji i izgledu ovih organizama (Nimis i sur. 2000).

Iako se lišajevi prilagođavaju različitim uvjetima zbog čega ih možemo naći na gotovo svim područjima Zemljine površine vrlo su osjetljivi na promjene okoliša u kojem žive. Upravo zbog toga što su dugoživi i većina njih spororastući organizmi koji gotovo cijelog života zadržavaju isti izgled, promjena morfologije, fiziologije, te bioraznolikosti lišaja na nekom području ukazuju na određene promjene u okolišu, zbog čega ih se već neko vrijeme koristi za biomonitoring kvalitete zraka te kao bioindikatore kvalitete zraka (Nimis i sur. 2000). Tako je na primjer u Londonu početkom dvadesetoga stoljeća zrak bio jako onečišćen industrijom i prometom te je na stablima udaljenim 16 km od centra, bilo zabilježeno samo 9 vrsta lišaja. Tijekom 1980-ih na stablima su se pojavile nove vrste lišaja te vrste koje su živjele na tom području u prošlom stoljeću poput vrsta *Parmelia tilacea* i *Lecanore albelt*. Povećanje broja i raznolikosti vrsta lišaja, bio je znak poboljšanja kvalitete zraka odnosno smanjenja količine smoga i koncentracije sumporovog (IV) oksida (Larsen i sur. 2007).

Postoje tri načina na koji se lišaji koriste za praćenje kvalitete zraka. Prvi tip je praćenje bioraznolikosti lišaja na nekom području, koji se temelji na činjenici da postoje različite razine tolerancije na onečišćenje kod lišajeva. Drugi tip je određivanje promjena u fiziologiji lišajeva. Izlaganje onečišćivačima može izazvati promjene u fotosintezi, količini klorofila i njegovoj degradaciji, promjene u stupnju produkcije etilena, propusnosti membrane, količini sekundarnih metabolita i dr. Treći tip temelji se na mjerenju količine onečišćivača u lišajevima, npr. teških metala koje nam pomažu u određivanju koncentracije tih onečišćivača u zraku (Conti i Cecchetti 2001).

1.3. Učinak dušikovih spojeva na lišajeve

Za razliku od prošloga stoljeća gdje je sumporov (IV) oksid bio glavni onečišćivač zraka koji je utjecao na biološku raznolikost lišaja, posljednjih desetljeća na raznolikost utječe povećana količina dušikovih spojeva u zraku. Dušikovi oksidi i amonijak smatraju se jednim od glavnih onečišćivača zraka koji značajno smanjuju raznolikost i rasprostranjenost lišajeva (Spier i sur. 2010). Kao glavni izvor dušikovih oksida smatra se sve jači promet tijekom kojeg izgaranjem fosilnih goriva nastaju velike količine ispušnih plinova. Izvor amonijaka u najvećoj mjeri uključuje životinjski otpad, kemijska gnojiva te gorenje biomase (Maslaňáková i sur. 2015). Prema nekim autorima upravo povećana količina amonijaka u zraku predstavlja glavni uzrok smanjene brojnosti nekih vrsta lišajeva (Frati i sur. 2006, Munzi i sur. 2009). U Toskani (Italija), Frati i sur. (2007) proveli su istraživanje u kojem su pomoću lišaja pratili emisiju amonijaka s okolne farme svinja. Rezultati su pokazali da je koncentracija amonijaka negativno povezana s udaljenošću od farme, da je emisija NH_3 utjecala na biološku raznolikost lišaja u tom području te da je koncentracija dušika u lišaja pozitivno povezana s koncentracijom amonijaka u zraku.

S obzirom na toleranciju lišajeva na količinu dušika, razlikujemo acidofilne vrste koje su jako osjetljive na povećanu količinu dušikovih spojeva i tolerantnije, nitrofilne vrste (Van Herk 2002 prema Munzi i sur. 2010). Provedena su brojna istraživanja o osjetljivosti pojedinih vrsta na povećane količine dušikovih spojeva. Tako se saznalo da su vrste poput *Evernia prunastri* i *Hypogimnia physodes* jako osjetljive dok su vrste poput *Xanthoria parietine* i *Physcia tenella* otpornije na povećanu razinu dušikovih spojeva (Spier i sur 2010). U ruralnim sredinama zbog povećanja koncentracija amonijaka uslijed poljoprivrednih aktivnosti, a urbanim sredinama zbog povećanja koncentracija dušikovih oksida uslijed povećanog prometa, smanjuje se populacija acidofilnih vrsta a povećava se populacija nitrofilnih vrsta (Frati i sur. 2006). Prema nekim autorima osjetljivost lišaja na povećanu količinu dušikovih spojeva ovisi o kapacitetu izmjene iona (Munzi i sur. 2010, Munzi i sur. 2013). Tako su vrste koje imaju veći kapacitet izmjene iona osjetljivije, dok su one s manjim kapacitetom izmjene iona tolerantnije na povećanje koncentracije dušikovih spojeva (Munzi i sur. 2010). Nitrofilne vrste zahvaljujući manjem kapacitetu izmjene iona mogu izbjeći apsorpciju povećane količine amonijevih iona jer enzimatskom aktivnošću neutraliziraju onu količinu koja je ušla u stanicu. Kod acidofilnih vrsta takav detoksikacijski sustav nije dovoljan, jer veliki kapacitet izmjene iona omogućava ulazak i taloženje veće količine amonijevih iona u stanice koji se ne stignu neutralizirati pa izazivaju promjene u organizmu (Munzi i sur. 2010, Munzi i sur. 2013). U osjetljivih vrsta lišajeva povećane količine dušika mogu uzrokovati degradaciju klorofila, stanična oštećenja koja se očituju u gubitku kalijeva iona, oštećenja stanične membrane te narušavanje simbiotskih odnosa (Carter i sur. 2017)

Toksičnost dušikovih spojeva ovisi i o vrsti dušikova spoja, količini, vremenu kojem su izloženi onečišćenju, intenzitetu svjetlosti i temperaturi kojoj su lišajevi izloženi, te o pH podloge. Istraživanje koje je pratilo utjecaj koncentracije i vremena izlaganja lišaja dušikovim spojevima u obliku amonijeva sulfata i amonijeva nitrata, pokazalo je da kratkotrajna izloženost niskim koncentracijama ($c(\text{NH}_4\text{NO}_3) = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) ne djeluje na početku niti na acidofilne niti na nitrofilne vrste (Munzi i sur. 2010). No, što je vrijeme izloženosti bilo duže to su acidofilne vrste pokazivale značajno veću osjetljivost. Pri visokim koncentracijama dušikovih spojeva ($c(\text{NH}_4\text{NO}_3) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$), kod acidofilnih vrsta su se već nakon prvog tretmana pojavili znakovi stresa, smanjila im se fotosintetska učinkovitost, dok su se kod nitrofilnih vrsta znakovi stresa pojavili nakon trećeg tretmana. Neki od pokazatelja toksičnog utjecaja praćeni u navedenom istraživanju bili su smanjena količina fotosintetskih pigmenata, povećani stupanj degradacije klorofila *a* izražen kao kvocijent feofitinizacije te povećana fluorescencija klorofila. Naime, u stresnim uvjetima učinkovitost procesa fotosinteze se smanji, pa se veći dio apsorbirane energije oslobodi u obliku fluorescencije (Maxwell i Johnson 2000). Stoga mjerenjem fluorescencije klorofila možemo otkriti mnogo o učinkovitosti fotosinteze.

1.4. Fotosinteza

Fotosinteza je jedan od važnijih procesa koji omogućuje život na Zemlji. Njome fotoautotrofni organizmi Sunčevu energiju pretvaraju u kemijsku energiju, a iz anorganskih spojeva, ugljikova (IV) oksida i vode, stvaraju organske spojeve. Fotosinteza je složeni proces kojeg se može podijeliti na dva dijela, primarni procesi ili svjetlosne reakcije i sekundarni procesi ili Calvinov ciklus. Tijekom primarnih procesa dolazi do oksidacije vode i nastanka visokoenergetskih spojeva ATP-a i NADPH-a, dok tijekom Calvinovog ciklusa dolazi do redukcije ugljikova (IV) oksida i nastanka ugljikohidrata.

Fotoautotrofni organizmi pomoću biljnih bojila apsorbiraju potrebnu svjetlosnu energiju. Lišaji, koji za fotobionta imaju alge, od pigmenata sadrže klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoide dok oni koji imaju cijanobakteriju kao fotobionta sadrže klorofil *a*, karotenoide, fikobilin i fikoeritrin (Nash 2008). Pri fotosintezi najveće značenje ima klorofil *a*, koji maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 430 i 662 nm. Ostali pigmenti služe kao pomoć, apsorbiraju svjetlost različitih valnih duljina i prenose na klorofil *a* i time proširuju spektar boja koji može pokrenuti fotosintezu. Tako, klorofil *b* maksimalno apsorbira svjetlost valnih duljina 453 i 642 nm, a karotenoidi svjetlost valnih duljina između 380 i 550 (Pevalek-Kozlina 2003). Ovi pigmenti nalaze se u tilakoidnim membranama kloroplasta u nakupinama, povezani sa specifičnim proteinima, čineći fotosisteme. Svaki fotosistem se sastoji od reakcijskog

središta, primarnog akceptora elektrona te antenskog sustava. U reakcijskom središtu nalazi se klorofil *a* koji može pokrenut svjetlosne reakcije, a antenski sustav čine ostali pigmenti koji služe za hvatanje i prevođenje svjetlosne energije do klorofila *a* u reakcijskom središtu. U tilakoidnim membranama postoji dva fotosistema, fotosistem I (P700) i fotosistem II (P680). U fotosistemu I nalazi se molekula klorofila *a* koja maksimalno apsorbira svjetlost valne duljine od 700 nm, a u fotosistemu II molekula klorofila *a* koja maksimalno apsorbira svjetlost valne duljine od 680 nm. Ovi fotosistemi međusobno su povezani transportnim lancem elektrona (Pevalek-Kozlina 2003).

Svjetlosne reakcije započinju apsorpcijom svjetlosti te prijenosom energije do klorofila *a* u reakcijskom centru. Nakon toga pobuđena molekula klorofila *a* prijenosi elektron na primarni akceptor u fotosistemu II. Primarni akceptor predaje elektron slijedećem akceptoru i tako duž transportnog lanca. Postoji dva moguća puta elektrona, ciklički i neciklički. U necikličkom putu sudjeluju oba fotosistema i ovim putem oslobađa se kisik i nastaju ATP i NADPH. U cikličkom toku sudjeluje samo fotosistem I. Ovaj put služi za nastanak dodatnog ATP i javlja se samo kada nema potrebe za nastankom NADPH.

Nakon svjetlosnih reakcija slijedi Calvinov ciklus koji se odvija u stromi kloroplasta. Calvinov ciklus obuhvaća vezanje ugljikova (IV) oksida i prevođenje u ugljikohidrate uz korištenje ATP i NADPH nastalih u primarnim reakcijama fotosinteze (Pevalek-Kozlina 2003).

1.4.1 Čimbenici koji utječu na fotosintezu

Uspješnost fotosinteze ovisi o uvjetima u kojima fotosintetski organizam živi. Na fotosintezu među ostalog utječe intenzitete svjetla, dostupnost dušika i drugih nutrijenata te vode.

Pri niskom intenzitetu svjetla stopa fotosinteze je smanjena. Povećanjem intenziteta svjetla dolazi do porasta stope fotosinteze sve dok ne dođe do zasićenja kada CO₂ postane limitirajući faktor (Vidaković-Cifrek i sur. 2014). Pod jakim intenzitetom svjetla apsorbirana energija je puno veća nego što se može iskoristiti u procesu fotosinteze te je u tim uvjetima obnova ADP i NADP⁺ potisnuta, a time fotosintetska efikasnost smanjena (Myake i sur. 2009). Jakost svjetla kojoj su biljke izložene utječe i na koncentraciju fotosintetskih pigmenata. Tako je najčešće pri svjetlu jačeg intenziteta smanjen udio klorofila *a* i *b*, a povećan je udio karotenoida, budući da karotenoidi imaju zaštitnu ulogu jer učinkovito oslobađaju višak energije u obliku topline (Franc i sur. 2007).

Za fotosintezu je potreban i dušik. U nižim količinama dušik je važan za sintezu klorofila, a također se nalazi u sastavu tilakoidnih proteina i enzima Calvinovog ciklusa

(Evans 1989). Zbog toga pri nešto većem sadržaju dušika u tkivu dolazi do povećanja stope fotosinteze (Vos i sur. 2005). Iako je dušik nužan element, prevelike količine su štetne. Povećanje količine dušika, u obliku amonijeva iona i dušikovih oksida vodi zakiseljavanju pigmenata što uzrokuje izlaženje središnjeg magnezijevog iona iz molekule klorofila i time pretvorbu klorofila *a* u feofitin, nefotokemijski pigment (Riddell i sur. 2012). Posljedice stvaranja feofitina su smanjenje stope fotosinteze i fiksacije CO₂. Ova degradacija klorofila *a* mjeri se određivanjem kvocijenta feofitinizacije odnosno omjera apsorbancije pri 435 nm i 415 nm (Lackovićova i sur. 2013).

Na fotosintetsku učinkovitost lišaja, uz količinu svjetlosti i količinu dušika, utječe i hidratiziranost talusa. Ovisno o vrsti fotobionta, lišaji zahtijevaju veći ili manji stupanj hidratacije talusa. Tako je cijanobakterijama potrebnije više, a zelenim algama manje vode za normalnu fotosintetsku aktivnost. Iako je voda nužna za fotosintezu prevelika količina šteti. U lišaja čiji talusi sadrže prevelike količine vode dolazi do pojave smanjenja udjela fotosinteze takozvane supersaturacije (Lange i sur. 2010).

Sun i sur. (2016) pokazali su da dušik može poboljšati proces fotosinteze u riže prilikom promjene intenziteta svjetla. Nakon što su biljku riže prebacili s mjesta gdje je bila zasićena svjetlošću na mjesto niskog intenziteta svjetlosti, smanjenje fotosinteze je bilo značajnije u uvjetima niže opskrbe dušikom nego pri višoj opskrbi dušika. Nakon premještanja biljaka riže s mjesta niskog intenziteta svjetla na mjesto jačeg intenziteta svjetla, vrijeme koje je bilo potrebno da se postigne 90% maksimalne fotosintetske aktivnosti bilo je značajno duže pri nižoj opskrbi dušika nego pri višoj. Čitajući ovo istraživanje dobili smo ideju za diplomski rad. Ideja je bila da bi možda pri većem intenzitetu svjetlosti, lišaj mogao "preusmjeriti" višak dušika u klorofil i proteine odnosno enzime koji sudjeluju u procesu fotosinteze i na taj način smanjiti toksičnost dušikovih spojeva.

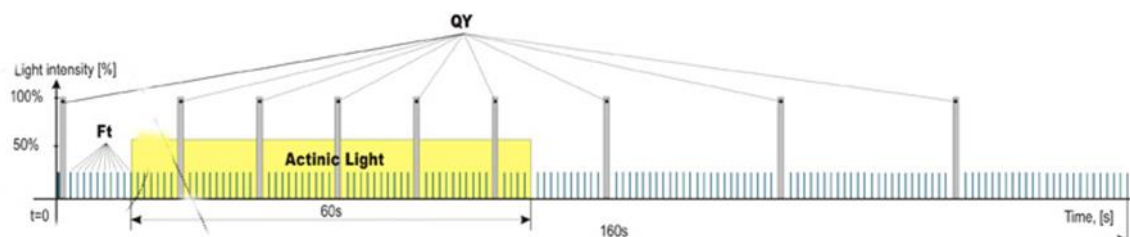
1.4.2. Fluorescencija klorofila *a*

Svjetlosna energija, koju apsorbiraju fotosintetski pigmenti i prenose do specijaliziranih molekula klorofila *a*, može se iskoristiti na tri načina. Najveći dio energije koristi se za fotokemijske reakcije fotosinteze, dio se oslobodi u obliku topline, a dio kao svjetlost. Oslobađanje energije u obliku svjetlosti naziva se fluorescencija. Ova tri načina iskorištenja apsorbirane energije ovise jedan o drugome. Tako, ako se poveća prinos jedne reakcije, smanjit će se prinos druge dvije reakcije (Maxwell i Johnson 2000). Udio fluorescencije u najvećoj mjeri ovisi o tome u kakvom je stanju akceptor elektrona plastokinon. Pri niskom intenzitetu svjetla molekule plastokinona su oksidirane i mogu primiti elektrone. U takvim uvjetima intenzitet fluorescencije je nizak jer se veliki dio energije koristi za fotokemijske

reakcije. Pri jakom intenzitetu svjetla većina plastokinona je reducirana pa je mali udio molekula plastokinona koje mogu primiti elektrone pa se veći dio energije oslobađa u obliku svjetlosti.

Najveći dio fluorescencije potječe s fotosistema II te zbog toga mjerenjem fluorescencije klorofila *a* dobivamo podatke o njemu. Ujedno, fotosistem II je i najpodložniji oštećenjima uzrokovanih različitim stresom, pa zbog toga mjerenjem fluorescencije možemo dobiti podatke o učinkovitosti fotosinteze (Vidaković-Cifrek i sur. 2014). Tehnika fluorescencije klorofila *a* učinkovito se koristi kod istraživanja različitih stresnih učinaka kod lišaja. Tako je do sada korištena za praćenje tolerancije i kroničnih učinaka teških metala (Paoli i sur. 2014), te utjecaja dušikovih spojeva na lišaje (Munzi i sur. 2010, Munzi i sur. 2012, Piccotto i sur. 2011). Fluorescencija klorofila *a* mjeri se pomoću uređaja koji se nazivaju fluorimetar.

Fluorescencija klorofila najčešće se mjeri metodom saturacijskog pulsa (Maxwell i Johnson 2000). Ovom metodom možemo dobiti podatke o maksimalnom i efektivnom prinosu fotosustava II te fotokemijskom i nefotokemijskom gašenju fluorescencije. Do nefotokemijskog gašenja fluorescencije dolazi u stresnim uvjetima koji mogu inhibirati fotosintezu i transport elektrona, kao što je na primjer visoki intenzitet svjetla kada se apsorbirana energija ne može iskoristiti u fotokemijskim reakcijama već se oslobađa u obliku topline. Fotokemijsko gašenje fluorescencije dolazi u uvjetima kada većina akceptora može primiti elektrone pa se apsorbirana energija koristi u najvišoj mjeri za fotokemijske reakcije (Vidaković-Cifrek i sur. 2014). Prije početka mjerenja fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa uzorci moraju biti 30 min u tami kako bi se reakcijski centri otvorili i mogli sudjelovati u reakciji. Mjerenje započinje obasjavanjem uzorka svjetlošću niskog intenziteta nedovoljnog za pokretanje fotokemijske reakcije. U takvim uvjetima se mjeri minimalna razina fluorescencije klorofila (F_0) prilagođenome na uvjete tame. Nakon toga primjenjuje se kratkotrajna svjetlost visokog intenziteta (saturacijski pulsevi) koja uzrokuje redukciju plastokinona. Tada uređaj bilježi maksimalnu razinu fluorescencije klorofila (F_m) u uzorku prilagođenome na uvjete tame. Slijedi uključivanje bijelog svjetla („actinic light“) koji uzrokuje pad intenziteta fluorescencije do ujednačene vrijednosti prinosa fluorescencije zbog pokretanja fotokemijskih reakcija. Tijekom uključenog bijelog svjetla primjenjuju se saturacijski pulsevi pri čemu se bilježe vrijednosti maksimalne fluorescencije (F_m') te fluorescencije ravnotežnog stanja (F_t) u uzorka prilagođenome na uvjete svjetla. Mjerenje završava gašenjem aktinичne svjetlosti (Vidaković-Cifrek i sur. 2014).



Slika 2 Prikaz postupka mjerenja parametra QYmax pomoću uređaja FluorPen, soznačenim intenzitetom svjetlosti na y osi u određenom vremenskom intervalu koji je naznačen na x osi grafa. Preuzeto i prilagođeno: FluorPen Manual and User Guide, 2015

1.5. Istraživana vrsta

Ovo istraživanje rađeno je na vrsti *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale (slika 3) koja je jedna od čestih vrsta u Hrvatskoj. Osim u Europi, rasprostranjena je i u Aziji, Africi, Sjevernoj i Južnoj Americi (Nash 2008). Ova vrsta je foliozni (listasti) lišaj iz porodice Parmeliaceae koji živi uglavnom na kori drveća i grmovima. Talus, kojeg čine režnjevi široki oko 1 cm, može narasti od 5 cm do 20 cm u promjeru. S gornje strane je žuto – zelene boje, a donja površina mu je u sredini crna, a prema rubovima smeđa. Zbog velike površine talusa dobar je materijal za praćenje onečišćenja zraka. Ovu vrstu koristili su u nekoliko istraživanja. Tako su Bačkor i sur. (2003) uz pomoć vrsta *Flavoparmelia caperata*, *Ramalina fastigiata* i *Physcia aipolia* pratili onečišćenje zraka u Košici, Slovačka. Također, ova vrsta je bila predmet istraživanja utjecaja teških metala poput kobalta, olova, bakara, kadmija na fotosintetsku aktivnost (Bačkor i sur. 2003, Maslač, 2016, Čuček, 2017). U tim istraživanjima pokazano je da teški metali negativno utječu na fotosintetsku učinkovitost i da dolazi do smanjenja koncentracije klorofila *a* i *b*, te karotenoida. Istraživanja su pokazala da je ova vrsta relativno otporna na kratkoročno izlaganje teškim metalima jer su se promjene pojavile tek nakon nekog vremena.

Piccotto i sur. (2011) pratili su utjecaj urbanog onečišćenja na fluorescenciju klorofila *a* pomoću vrsta *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale i *Parmotrema perlatum* (Huds.) M. Choisy. Istraživanje je pokazalo da dušikovi oksidi negativno utječu na nefotokemijsko gašenje te da je pad vrijednosti nefotokemijskog gašenja povezan s vremenom izloženosti i koncentracijom dušikovih oksida kojoj su izloženi. Rezultati su pokazali da je vrsta *Flavoparmelia caperata* osjetljivija na izloženost dušikovim oksidima od ostale dvije jer su se značajne promjene u vrijednostima fluorescencijskih parametara

pojavile već nakon polovice vremena trajanja pokusa. Međutim, u dostupnoj literaturi vrsta *Flavoparmelia caperata* nije svrstana niti u acidofilne niti u nitrofilne vrste.



Slika 3 Vrsta *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale. Preuzeto i prilagođeno prema : http://www.lichens.lastdragon.org/Flavoparmelia_caperata.html

1.6. Cilj istraživanja

Zbog svoje anatomije i različitog reagiranja pojedinih vrsta lišaja na promijene u okruženju u kojem žive, lišaji su dobri pokazatelji stupnja onečišćenja.

Cilj ovog diplomskoga rada bio je:

- utvrditi kako povećana količina dušika utječe na vrstu *Flavoparmelia caperata*, za koju nema literaturnih podataka o osjetljivosti na dušik, praćenjem fotosintetske učinkovitosti, mjerenjem udjela klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u tkivu lišaja te kvocijenta feofitinizacije
- utvrditi je li ova vrsta osjetljivija na dušik prisutan u obliku amonijevih iona ili u obliku nitrata
- utvrditi kako na toksičnost dušika utječe intenzitet svjetla kojem je lišaj izložen

2. Materijal i metode

2.1. Materijal

Istraživanje je provedeno na vrsti *Flavoparmelia caperata* (L) Hale. Lišaji su sakupljeni krajem 2016. godine na području hrastove šume u Kerestincu, Sveta Nedjelja, Zagreb. Kako su lišaji sakupljeni zajedno s korom, prije početka postavljanja pokusa uzorci su odvojeni od kore i očišćeni od stranih materijala. Uzorke su činili talusi lišaja podjednakih veličina i oblika. Ukupno ih je bilo 48. Očišćeni uzorci stavljeni su na mrežice koje su prethodno učvršćene na Petrijeve zdjelice na čije dno je stavljen filter papir koji je navlažen destiliranom vodom. Petrijeve zdjelice s uzorcima odnešene su u klima komoru kako bi se prilagodili uvjetima u kojima će se odvijati pokus. Uvjeti u klima-komori su bili 16 h svjetla ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i 8 h tame uz temperaturu $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzorci su bili 14 dana na aklimatizaciji u klima komori gdje su svakodnevno špricani destiliranom vodom. Nakon aklimatizacije uzorci su podijeljeni u četiri grupe i tretirani dušikovim spojevima.

2.2. Metode

2.2.1. Priprema otopina

Otopinu amonijeva nitrata, koncentracije 1 mol dm^{-3} , pripremila sam tako što sam 20 grama amonijevog nitrata i otopila u 250 mL destilirane vode. pH-vrijednost sam podesila na 6,5 pomoću pH-metra.

Otopinu amonijeva sulfata, koncentracije $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pripremila sam na način da sam 25,28 grama kalijevog nitrata otopila u 250 mL destilirane vode. pH-vrijednost sam podesila na 6,5 pomoću pH-metra.

Otopinu kalijeva nitrata, koncentracije 1 mol dm^{-3} , pripremila sam na način da sam 16,51 grama amonijevog sulfata otopila u 250 mL destilirane vode. pH-vrijednost sam podesila na 6,5 pomoću pH-metra.

2.2.2. Tretiranje otopinama

Uzorke lišaja grupirala sam u četiri grupe po 12 uzoraka. Prvu grupu tretirala sam uranjanjem u otopinu amonijeva nitrata, drugu u otopinu amonijeva sulfata, treću u otopinu kalijeva nitrata. Četvrtu grupu, koja mi je poslužila kao kontrola, uronila sam u vodu pH-vrijednosti 6,5. Uzorci su tretirani 30 minuta. Nakon toga sam lišajeve stavila na prije spomenute mrežice i odnijela u klima komoru. Šest uzoraka iz svake grupe stavila sam pod

utjecaj jačeg intenziteta svjetla ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a drugu polovicu pod utjecaj slabijeg intenziteta svjetla ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tijekom trajanja pokusa uzorci su svakodnevno špricani destiliranom vodom pH vrijednosti 6,5.

2.2.3. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Trećeg, sedmog i četrnaestog dana nakon postavljanja pokusa mjerila sam fluorescenciju klorofila *a*. Prije početka mjerenja uzorke sam dobro navlažila destiliranom vodom pH vrijednosti 6,5 te sam ih stavila u zamračeni prostor na 30 minuta kako bi se uzorci prilagodili uvjetima u tami. Fluorescenciju sam mjerila pomoću fluorimetra FluorPen FP 100. Kvačicu, kojom sam uhvatila talus lišaja, učvrstila sam na fluorimetar. Na uređaju sam odabrala mjerenje po protokolu za određivanje nefotokemijskog gašenja (NPQ1) koje prema postavkama odgovara metodi saturacijskog pulsa. Nakon svakog mjerenja uzela sam dio uzoraka za mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata. Ostatak uzorka vratila sam natrag na Petrijevu zdjelicu te sam ga iskoristila za slijedeća mjerenja.

Nakon završetka mjerenja fluorimetar sam pomoću USB kanala povezala s računalom, na kojem sam pomoću posebnog programa prenijela podatke i očitala dobivene vrijednosti. Mjerenjem po ovom protokolu mogu se očitati slijedeći fluorescencijski parametri: maksimalni prinos fotosustava II, efektivni prinos fotosustava II na svjetlu, koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije i nefotokemijsko gašenje fluorescencije.

Uređaj Fluorpen određuje vrijednosti fluorescencijskih parametara prema formulama (FluorPen Manual and User Guide, 2015):

$$QY_max = F_m - F_0 / F_m$$

$$QY_L = (F_m_Ln - F_t_Ln) / F_m_Ln$$

$$QP = (F_m_Ln - F_t_Ln) / (F_m_Ln - F_0_Ln)$$

$$NPQ = (F_m - F_m_Ln) / F_m_Ln$$

Pri čemu je:

QY_max = maksimalni kvantni prinos fotosustava II

QY_L = kvantni prinos fotosustava II na svjetlu

QP = koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije

NPQ = nefotokemijsko gašenje fluorescencije

F_0 = prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame

F_m = maksimalni prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame

F_m_Ln = maksimalni prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete svjetla

F_t_Ln = vrijednost fluorescencije ravnotežnog stanja u listu prilagođenome na uvjete svjetla

2.2.4. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Uzorke koje sam uzela trećeg, sedmog i četrnaestog dana osušila sam u liofilizatoru (Alfa 1-2, Christ, Njemačka). Nakon sušenja sam ih usitnila i od svakoga sam uzela oko 10 mg za ekstrakciju klorofila. U tubice s uzorcima dodala sam na vrh spatule magnezijeva karbonata i 1,5 mL dimetilsulfoksida. Uzorke sam nakon toga stavila na vortex te zatim u vodenu kupelju na inkubaciju 40 minuta pri 65 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 20 minuta pri sobnoj temperaturi, na 25000 g. Supernatant sam odpipetirala u nove zatamnjene tubice. Kako se u njemu nalaze fotosintetski pigmenti, poslužio mi je za mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata. Prelijevala sam ih u staklenu kivetu te spektrofotometrom (Specord-50, Analytik-Jena, Njemačka) mjerila apsorbanciju pri valnim duljinama od 415, 435, 480, 649, 665 te 750 nm. Koncentraciju fotosintetskih pigmenata odredila sam prema formulama (Kranner i sur, 2002):

a) Maseni udio klorofila *a* u tkivu (mg/g suhe tvari): $ca = \frac{12,9 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649}}{m \cdot 1000}$

b) Maseni udio klorofila *b* u tkivu (mg/g suhe tvari): $cb = \frac{21,99 \cdot A_{649} - 5,32 \cdot A_{665}}{m \cdot 1000}$

c) Maseni udio ukupnih karotenoida u tkivu (mg/g suhe tvari):

$$ck = \frac{(1000 \cdot A_{480} - 2,14 \cdot ca - 70,16 \cdot cb)/220}{m \cdot 1000}$$

d) Kvocijent feofitinizacije: $FC = \frac{A_{435}}{A_{415}}$

pri čemu je:

$A_{480}/665/649/435/415$ = apsorbancije uzoraka pri određenim valnim duljinama

m = masa uzorka

2.2.5. Obrada podataka

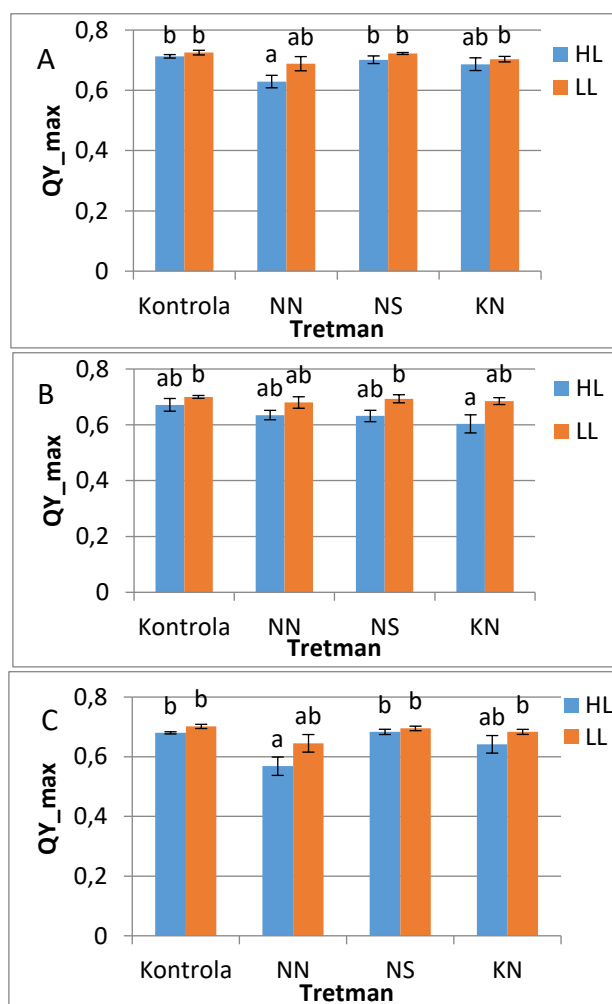
Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti šest replika po tretmanu ± standardna pogreška. Za obradu podataka korišteni su Microsoft Excel 2016 i Statistica 12 (StatSoft Inc., SAD). Rezultate sam usporedila analizom varijance (one-way ANOVA). Koristeći Tukey's test utvrdila sam koji se uzorci značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$. Ako postoji statistički značajna razlika među rezultatima to je na grafu označeno drugačijim slovom.

3. Rezultati

3.1. Fluorescencija klorofila *a*

3.1.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane dušikovim spojevima i izložene svjetlu jačeg intenziteta (HL), najvišu vrijednost maksimalnog kvantnoga prinosa fotosustava II (QY_{max}) ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata (NS), a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (NN). Među grupama koje su tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta (LL), najvišu QY_{max} vrijednost također ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 4A).



Slika 4 Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}), u lišaja *Flavoparmelia caperata*, izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta vrijednost QY_max, trećeg dana za sve grupe lišaja koje su bile tretirane niža od vrijednosti njihove kontrolne grupe. Za grupu koja je tretirana otopinom amonijeva nitrata ta razlika je bila i statistički značajna ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu i grupu tretiranu amonijevim sulfatom. Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata (KN) imaju nižu vrijednost nego njihova kontrolna grupa dok grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata ima jednaku vrijednost kao i kontrolna grupa. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Sve grupe koje su bile izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju više vrijednosti QY_max nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta iako razlike nisu statističke značajne (slika 4A).

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu QY_max vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 4B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da sve grupe lišaja koji su bile tretirane dušikovim spojevima imaju nižu vrijednost QY_max nego njihova kontrolna grupa. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Pri svjetlu slabijeg intenziteta sve grupe imaju višu vrijednost QY_max nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$) (slika 4B).

Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu QY_max vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QY_max vrijednost također ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 4C).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu slabijeg intenziteta sve grupe lišaja koje su bile tretirane imaju nižu vrijednost QY_max nego njihova kontrolna grupa. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Pri svjetlu jačeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju nižu vrijednost QY_max nego njihova kontrolna grupa, dok grupa lišaja koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata ima malo višu vrijednost QY_max nego kontrolna grupa. Za grupu lišaja koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata ta razlika je i statistički značajna u odnosu na kontrolnu grupu i grupu tretiranu amonijevim sulfatom ($P < 0,05$). Sve grupe lišaja

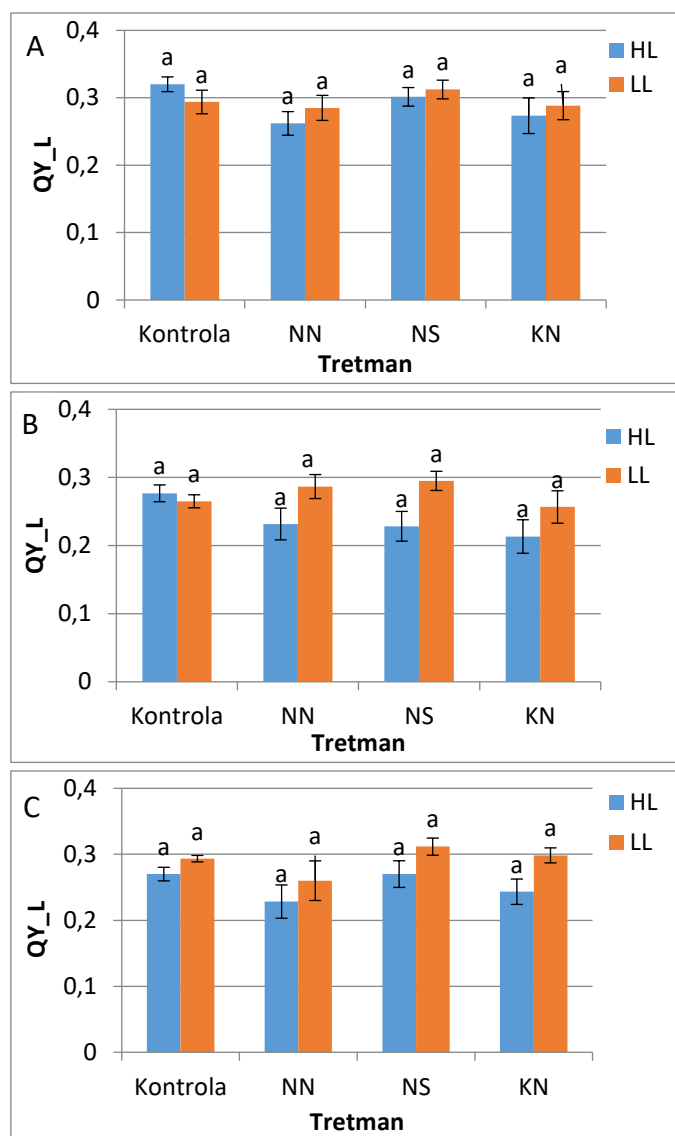
izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju višu vrijednost QY_max nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta iako razlike nisu statističke značajne (slika 4C).

3.1.2. Efektivni prinos fotosustava II na svjetlu

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu vrijednost prinosa fotosustava II na svjetlu (QY_L) ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QY_L vrijednost također ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 5A).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta sve grupe lišaja koje su bile tretirane imaju nižu vrijednost QY_L nego njihova kontrolna grupa. Međutim, uočene razlike nisu bile statistički značajne. Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju nižu vrijednost QY_L nego njihova kontrolna grupa, dok ona koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata ima višu vrijednost QY_L nego kontrolna grupa. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne. Grupe lišaja koje su bile tretirane dušikovim spojevima i izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju višu vrijednost QY_L nego one tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta. Obrnuto, kontrolna grupa pri svjetlu jačeg intenziteta ima višu vrijednost QY_L nego ona izložena svjetlu slabijeg intenziteta. Uočene razlike nisu bile statistički značajne (slika 5A).

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu QY_L vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijev nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QY_L vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata (slika 5B).



Slika 5 Efektivni prinos fotosustava II na svjetlu (QY_L) u lišaja *Flavoparmelia caperata*, izražen kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta sve grupe lišaja koje su bile tretirane imaju nižu vrijednost QY_L nego njihova kontrolna grupa. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne. Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili amonijeva nitrata imaju višu vrijednost QY_L nego njihova kontrolna grupa, dok ona koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata ima nižu vrijednost QY_L nego kontrolna grupa. Međutim, primijećene razlike nisu bile statistički značajne (slika 5B). Grupe koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju višu vrijednost

QY_L nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta. Primijećene razlike nisu bile statistički značajne. Obrnuto, kontrolna grupa pri svjetlu jačeg intenziteta ima višu vrijednost QY_L nego ona izložena svjetlu slabijeg intenziteta.

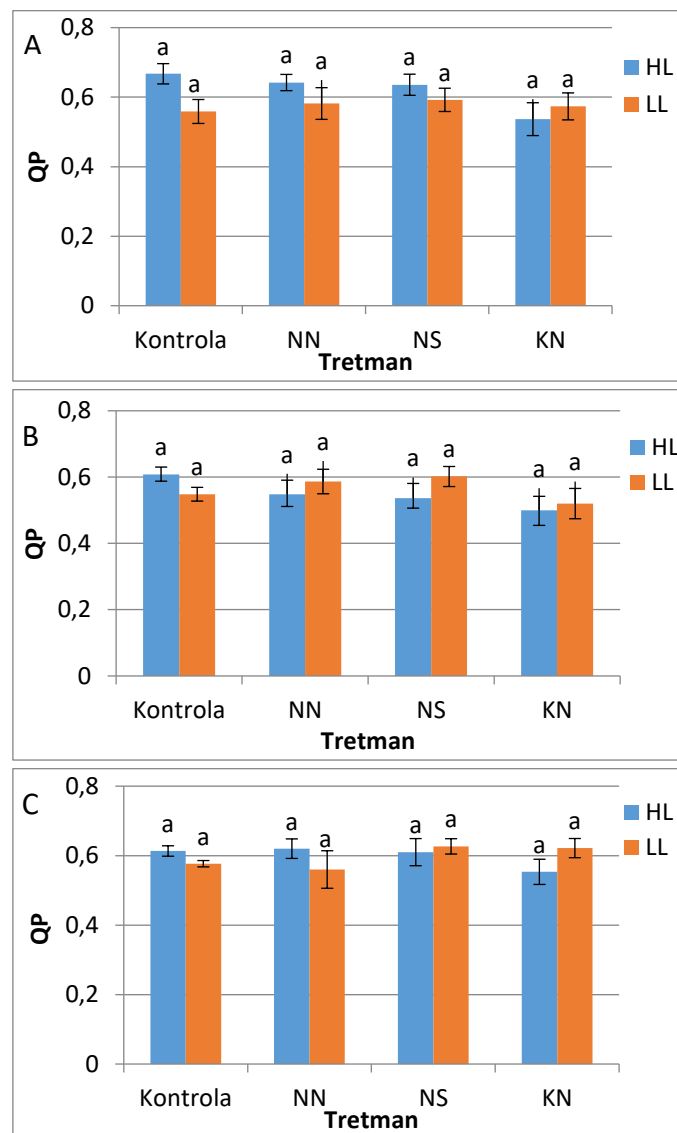
Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu QY_L vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QY_L vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 5C).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata i otopinom kalijeva nitrata, četrnaestog dana, imaju višu vrijednost QY_L nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata ima nižu vrijednost nego kontrolna grupa. Međutim, primijećene razlike nisu bile statistički značajne. Grupe koje su bile izložene svjetlu jačeg intenziteta i tretirane ili otopinom amonijeva nitrata i otopinom kalijeva nitrata imaju nižu vrijednost QY_L nego njihova kontrolna grupa, dok grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata ima sličnu vrijednost kao kontrolna grupa. Sve grupe lišaja, izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju višu vrijednost QY_L nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne (slika 5C).

3.1.3. Koeficijent fotokemijskog gašenja fluorescencije

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu vrijednost koeficijenta fotokemijskog gašenja (QP) ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QP vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata (slika 6A).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta sve grupe lišaja imaju nižu vrijednost QP nego njihova kontrolna grupa. Pri svjetlu jačeg intenziteta sve grupe lišaja imaju višu vrijednost QP nego njihova kontrolna grupa. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne. Kontrolna grupa i grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili otopinom amonijeva nitrata, izložene svjetlu jačeg intenziteta imaju višu QP vrijednost nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Grupa koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata i izložena svjetlu slabijeg intenziteta, ima višu QP vrijednost nego ona izložena svjetlu jačeg intenziteta. Međutim, uočene razlike nisu bile statistički značajne (slika 6A) .



Slika 6 Koeficijent fotokemijskog gašenja (QP) fluorescencije u lišaja *Flavoparmelia caperata*, izražen kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Općenito, rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu vrijednost fotokemijskog gašenja (QP) ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QP vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata (slika 6B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta sve tretirane grupe sedmog dana imaju nižu QP vrijednost nego njihova kontrolna grupa. Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili otopinom amonijeva nitrata imaju višu QP vrijednost nego kontrolna grupa, dok grupa lišaja koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata ima nižu QP vrijednost nego kontrolna grupa. Međutim, uočene razlike nisu bile statistički značajne. Sve grupe lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju višu QP vrijednost nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta. Obrnuto, kontrolna grupa koja je bila izložena svjetlu jačeg intenziteta ima višu QP vrijednost nego ona izložena svjetlu slabijeg intenziteta. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne (slika 6B).

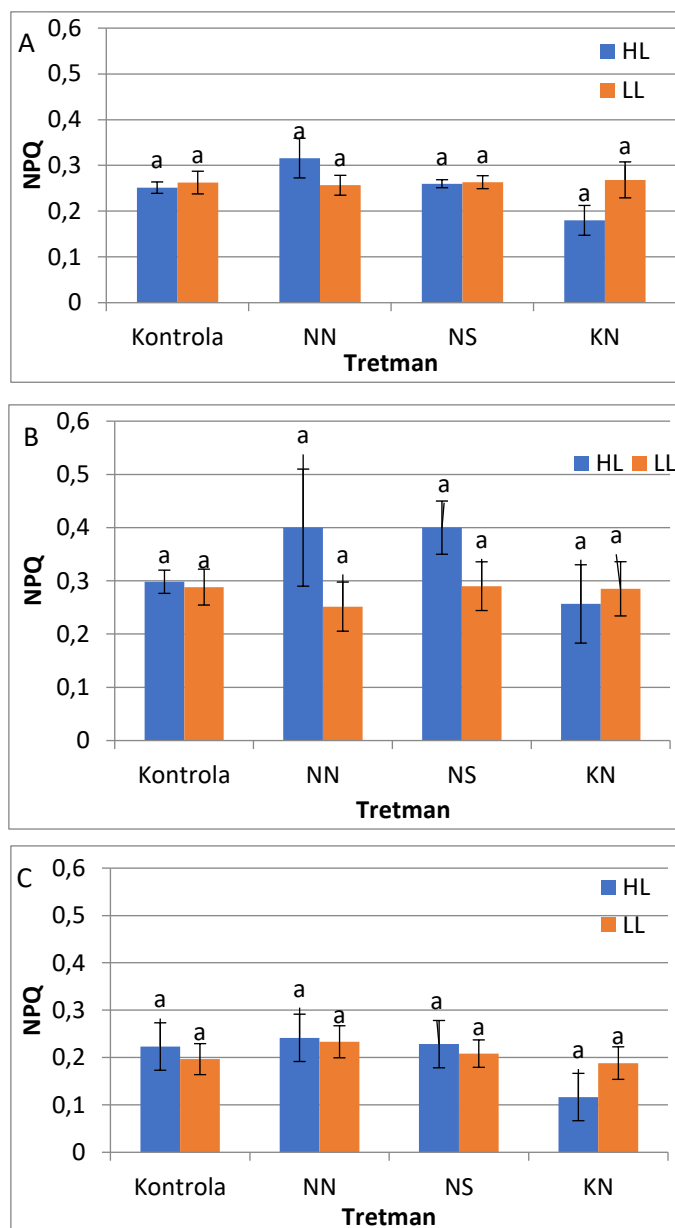
Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu vrijednost fotokemijskog gašenja (QP) ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu QP vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 6C).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane otopinom ili amonijeva sulfata ili amonijeva nitrata imaju četrnaestog dana vrlo sličnu QP vrijednost kao i njihova kontrolna grupa. Grupe lišaja koje su bile izložene svjetlu slabijeg intenziteta i tretirane ili otopinom kalijeva nitrata ili otopinom amonijeva sulfata imaju višu QP vrijednost nego njihova kontrolna grupa, dok grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata ima nešto nižu vrijednost nego kontrolna grupa. Međutim, uočene razlike nisu bile statistički značajne. Pri jačem intenzitetu svjetla, kontrolna grupa i grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata imaju višu QP vrijednost nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Pri slabijem intenzitetu svjetla grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom kalijevih nitrata ili amonijeva sulfata izloženih imaju višu QP vrijednost nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta. Međutim, uočene razlike nisu bile statistički značajne (slika 6C).

3.1.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu NPQ vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Grupe koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, imaju vrlo slične NPQ vrijednost (slika 7A). Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najvišu NPQ

vrijednost ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$).



Slika 7 Nefotokemijsko gašenje (NPQ) fluorescencije u lišaja *Flavoparmelia caperata*, izraženo kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta lišajevi koji su tijekom pokusa bili tretirani otopinom amonijeva nitrata imaju nešto višu NPQ vrijednost nego njihova kontrolna grupa dok grupa koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata ima nižu vrijednost

NPQ nego kontrolna grupa. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$). U lišajeva koji su tijekom pokusa bili izloženi slabijem svjetlu nisu primijećene razlike u NPQ vrijednostima između grupa izloženih različitim tretmanima. Kontrolna grupa te osobito grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, izložene svjetlu slabijeg intenziteta imaju višu NPQ vrijednost nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta (slika 7A). U grupi koja je tretirana otopinom amonijeva nitrata i izložena svjetlu jačeg intenziteta, NPQ vrijednost je viša nego li u grupi koja je tretirana otopinom amonijeva nitrat i izložena svjetlu slabijeg intenziteta. Primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među lišajima koji su bili tretirani i izloženi svjetlu jačeg intenziteta, najvišu NPQ vrijednost ima grupa lišaja tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu NPQ vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (slika 7B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta lišaji tretirani ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom amonijeva sulfata imaju sedmog dana pokusa nešto višu NPQ vrijednost nego njihova kontrolna grupa dok grupa lišaja koja je bila tretirana otopinom kaljeva nitrata ima nižu vrijednost NPQ nego kontrolna grupa. Pri svjetlu slabijeg intenziteta lišaji koji su bili tretirani otopinom amonijeva nitrata imaju nižu NPQ vrijednost nego njihova kontrolna grupa. Lišaji koji su bili tretirani otopinom amonijeva sulfata imaju malo višu NPQ vrijednost nego njihova kontrolna grupa dok grupa koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata ima vrijednost NPQ sličnu kao i kontrolna grupa. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$). Kontrolna grupa te osobito grupe tretirane otopinama amonijeva nitrata i amonijeva sulfata, izložene svjetlu jačeg intenziteta imaju višu NPQ vrijednost nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Obratno, grupa lišaja koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata i izložena svjetlu slabijeg intenziteta ima nešto višu NPQ vrijednost nego li ona izložena svjetlu jačeg intenziteta. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne (slika 7B).

Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među lišajima koji su bili tretirani i izloženi svjetlu jačeg intenziteta najnižu NPQ vrijednost ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta, najvišu NPQ vrijednost ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata (slika 7C).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta lišaji koji su bili tretirani ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom amonijeva sulfata imaju četrnaestog dana pokusa

nešto višu NPQ vrijednost nego njihova kontrolna grupa dok grupa koja je tretirana otopinom kalijeva nitrata ima nižu vrijednost NPQ nego kontrolna grupa. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$). Kontrolna grupa i grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili amonijeva sulfata, izložene svjetlu jačeg intenziteta imaju nešto višu NPQ vrijednost nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta (slika 7C). Grupa lišaja koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata i izložena svjetlu slabijeg intenziteta ima višu NPQ vrijednost nego ona izložena svjetlu jačeg intenziteta. Međutim primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

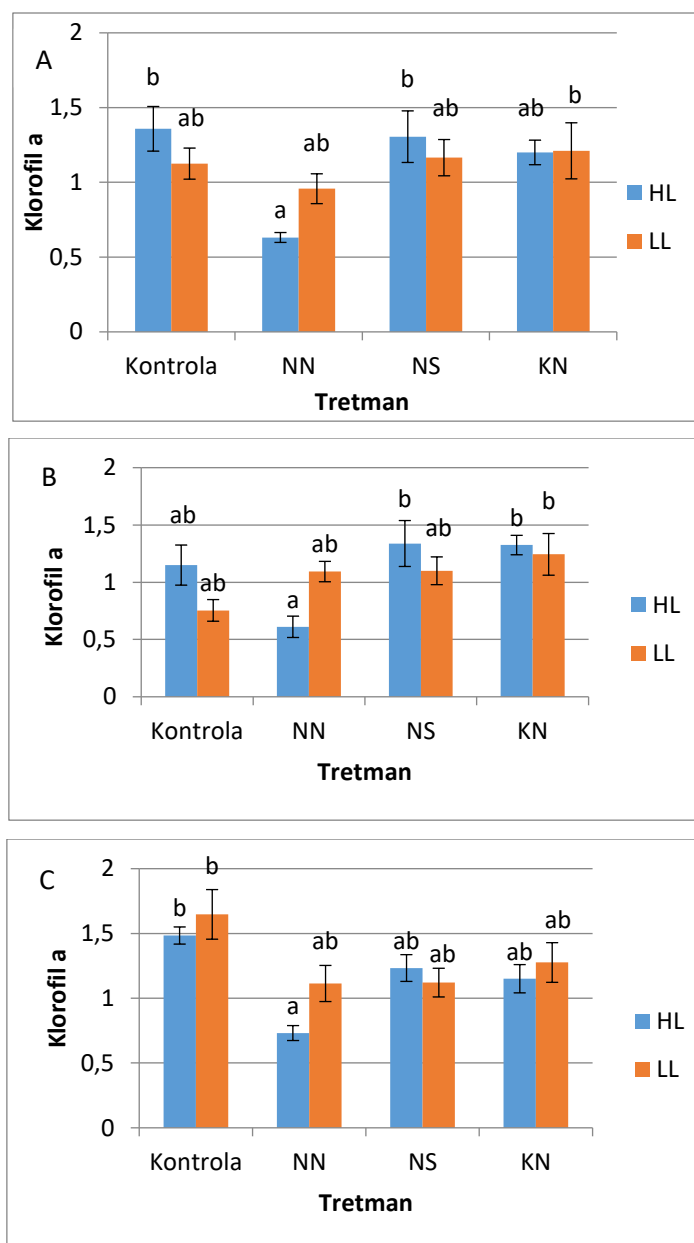
3.2. Fotosintetski pigmenti

3.2.1. Maseni udio klorofila *a*

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najniži maseni udio klorofila *a* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najniži udio klorofila *a* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom kalijevim nitratom (slika 8A).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta sve tretirane grupe imaju niži udio klorofila *a* nego njihova kontrolna grupa. Za grupu lišaja koje su bili tretirani otopinom amonijeva nitrata ta razlika je i statistički značajna ($P<0,05$) u usporedbi s kontrolnom grupom i grupom izloženom otopini amonijeva sulfata (slika 8A). Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili kalijeva nitrata imaju sličnu ili malo viši udio klorofila *a* nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata ima niži udio nego kontrolna grupa. Međutim ove primijećene razlike nisu bile statistički značajne ($P>0,05$).

Kontrolna grupa i grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata pri svjetlu jačeg intenziteta ima viši udio klorofila *a* nego pri svjetlu slabijeg intenziteta. Međutim ove primijećene razlike nisu bile statistički značajne. Grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju viši udio klorofila *a* pri svjetlu slabijeg intenziteta nego one pri svjetlu jačeg intenziteta. Međutim ove primijećene razlike nisu bile statistički značajne (slika 8A).



Slika 8 Maseni udio klorofila *a* u tkivu ($\mu\text{g}/\text{mg}$), izražen kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najniži maseni udio klorofila *a* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najniži udio klorofila *a* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom kalijevim nitratom (Slika 8B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu slabijeg intenziteta sve tretirane grupe sedmog dana imaju viši udio klorofila *a* nego njihova kontrolna grupa. Međutim ove primijećene razlike nisu bile statistički značajne. Pri svjetlu jačeg intenziteta grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili otopinom kalijeva nitrata imaju viši udio klorofila *a* nego njihova kontrolna grupa, dok grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata ima niži udio nego kontrolna grupa. Međutim ove primijećene razlike nisu bile statistički značajne. Međutim grupe tretirane otopinom amonijeva sulfata odnosno otopinom kalijeva nitrata imaju značajno viši udio klorofila *a* od grupe tretirane amonijevim nitratom ($P < 0,05$). Kontrolna grupa i grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili otopinom kalijeva nitrata, imaju viši udio klorofila *a* pri svjetlu jačeg intenziteta nego one pri svjetlu slabijeg intenziteta. Grupa lišaja koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata ima viši udio klorofila *a* pri svjetlu slabijeg intenziteta nego pri svjetlu jačeg intenziteta. Međutim ove primijećene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 8B).

Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najniži maseni udio klorofila *a* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom amonijeva sulfatom. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najniži udio klorofila *a* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom kalijevim nitratom (Slika 8C).

Usporedbom rezultata vidljivo je da sve tretirane grupe četrnaestog dana imaju niži udio klorofila *a* nego njihova kontrolna grupa. Za grupu tretiranu otopinom amonijeva nitrata, pri svjetlu jačeg intenziteta ta razlika je i statistički značajna ($P < 0,05$). Pri svjetlu slabijeg intenziteta, kontrolna grupa i grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju viši udio klorofila *a* nego one pri svjetlu jačeg intenziteta. Grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata pri svjetlu jačeg intenziteta ima viši udio klorofila *a* nego pri svjetlu slabijeg intenziteta (Slika 8C). Zapažena razlika nije bila statistički značajna.

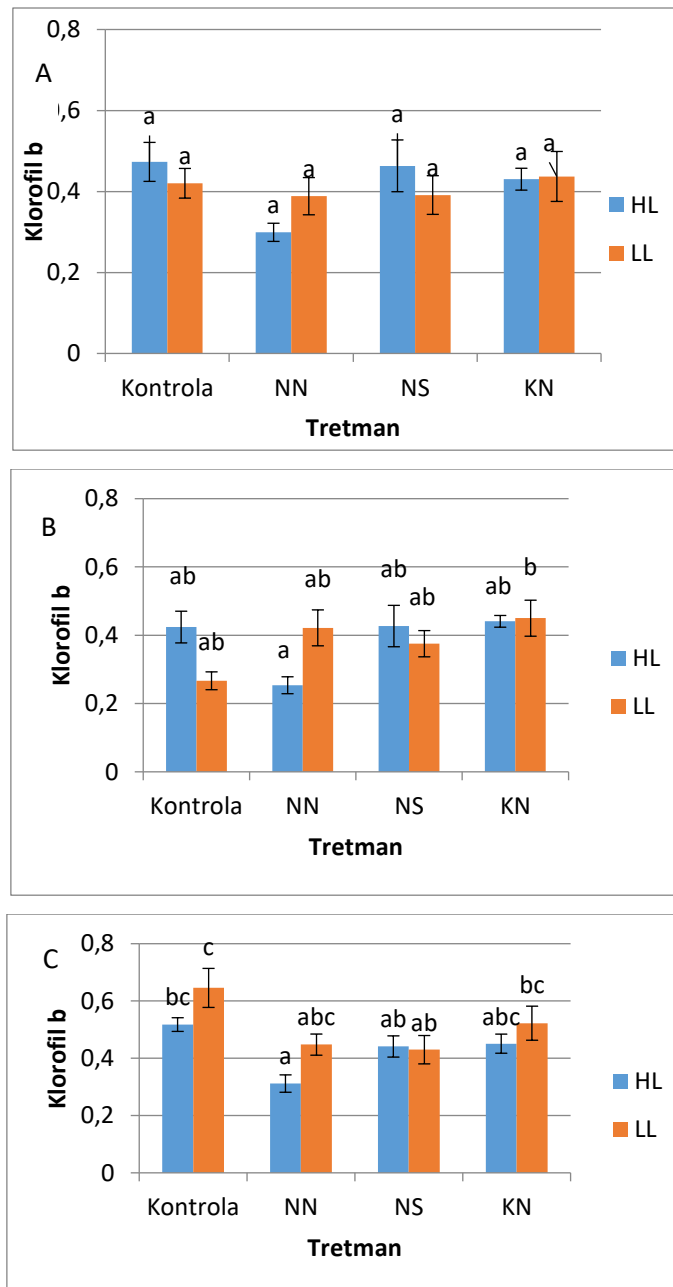
3.2.2. Maseni udio klorofila *b*

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najniži maseni udio klorofila *b* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najniži udio klorofila *b* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom kalijevim nitratom (Slika 9A).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom kalijeva nitrata imaju niži udio klorofila *b*, nego njihova kontrolna grupa, dok grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata ima viši udio nego kontrolna grupa. Međutim, zapažene razlike nisu bile statistički značajne. Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupa lišaja koja je bila tretirana ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom amonijeva sulfata ima niži udio klorofila *b* nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata ima viši udio nego kontrolna grupa. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 9A). Pri svjetlu jačeg intenziteta kontrolna grupa i grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata imaju višu koncentraciju klorofila *b* nego pri svjetlu slabijeg intenziteta. Grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata pri svjetlu slabijeg intenziteta, imaju višu koncentraciju klorofila *b* nego one pri svjetlu jačeg intenziteta. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne.

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najniži maseni udio klorofila *b* ima grupa tretirana amonijevim nitratom, a najviši grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najniži udio klorofila *b* ima grupa tretirana amonijevim sulfatom, a najviši grupa tretirana otopinom kalijevim nitratom (Slika 9B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu slabijeg intenziteta sve tretirane grupe imaju viši udio klorofila *b* nego njihova kontrolna grupa. Međutim, zapažene razlike nisu bile statistički značajne. Grupe lišaja koje su bile izložene svjetlu jačeg intenziteta i tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili otopinom kalijeva nitrata imaju podjednaki udio klorofila *b* kao njegova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata ima niži maseni udio klorofila *b* nego njena kontrolna grupa. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne. Pri svjetlu jačeg intenziteta, kontrolna grupa i grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata, ima viši udio klorofila *b* nego ona izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Grupe tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata pri svjetlu slabijeg intenziteta, imaju viši udio klorofila *b* nego one izložene svjetlu jačeg intenziteta. Uočene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 9B).



Slika 9 Maseni udio klorofila *b* ($\mu\text{g}/\text{mg}$), izražena kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana postavljanja pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najviši udio klorofila *b* ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najviši udio klorofila *b* ima

grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata (Slika 9C).

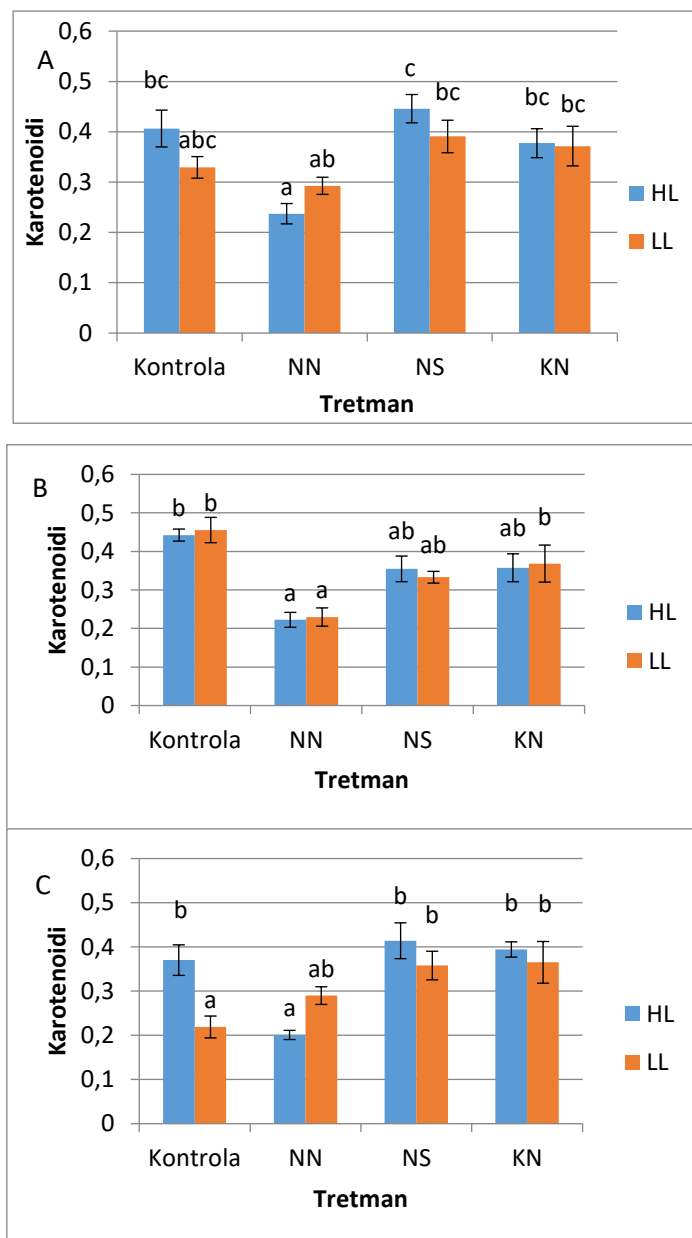
Usporedbom rezultata vidljivo je da su u svim tretiranim grupama udio klorofila *b* četrnaestog dan niži nego li u njihovim kontrolnim grupama. Za grupe tretirane ili otopinom amonijeva nitrata pri svjetlu jačeg intenziteta ili otopinom amonijeva sulfata pri svjetlu slabijeg intenziteta ta razlika je bila statistički značajna ($P < 0,05$) (Slika 9C). Pri svjetlu slabijeg intenziteta kontrolna grupa i grupe koje su bile tretirane otopinom ili amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju viši udio klorofila *b* nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Lišaji koji su bili tretirani otopinom amonijeva sulfata, izloženi svjetlu jačeg intenziteta imaju malo višu koncentraciju klorofila *b* nego oni izloženi svjetlu slabijeg intenziteta. Zapažene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 9C).

3.2.3. Maseni udio ukupnih karotenoida

Općenito, rezultati nakon trećeg dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta, najveći maseni udio karotenoida ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najveći maseni udio karotenoida također ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (Slika 10A).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta grupe tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom kalijeva nitrata trećeg dana imaju niži maseni udio karotenoida nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata ima nešto viši maseni udio nego kontrolna grupa. Za grupu koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata ta razlika je statistički značajna u odnosu na kontrolnu grupu kao i sve ostale tretmane ($P < 0,05$) (Slika 10A). Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili otopinom kalijeva nitrata imaju nešto viši maseni udio karotenoida nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata ima niži nego kontrolna grupa. Međutim, zapažene razlike nisu bile statistički značajne.

Pri svjetlu jačeg intenziteta kontrolna grupa i grupe lišaja koja su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili kalijeva nitrata imaju viši udio karotenoida nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Lišaji koji su bili tretirani otopinom amonijeva nitrata, izloženi svjetlu slabijeg intenziteta imaju viši maseni udio karotenoida nego oni izloženi svjetlu jačeg intenziteta. Međutim, zapažene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 10A).



Slika 10 Maseni udio ukupnih karotenoida ($\mu\text{g}/\text{mg}$), izražena kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,5$). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile izložene svjetlu jačeg intenziteta, najviši maseni udio karotenoida ima grupa koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najviši udio karotenoida ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (Slika 10B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu slabijeg intenziteta sve grupe koje su bile tretirane imaju viši maseni udio karotenoida nego njihova kontrolna grupa. Za grupe koje su bile tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili kalijeva nitrata ta razlika je statistički značajna. Pri svjetlu jačeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane otopinom ili kalijeva nitrata ili amonijeva sulfata imaju nešto viši udio karotenoida nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata ima statistički značajno nižu ($P < 0,05$) udio karateoida nego kontrolna grupa te ostali tretmani (Slika 10B). Pri svjetlu jačeg intenziteta kontrolna grupa i grupe tretirane otopinama ili amonijeva sulfata ili kalijeva nitrata imaju viši udio karotenoida nego pri svjetlu slabijeg intenziteta. Grupa lišaja tretirana otopinom amonijeva nitrata ima viši udio karotenoida pri svjetlu slabijeg intenziteta nego pri svjetlu jačeg intenziteta. Međutim, zapažene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 10B).

Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile izložene svjetlu slabijeg intenziteta najviši maseni udio karotenoida ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najnižu grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najniži udio karotenoida ima grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (Slika 10C).

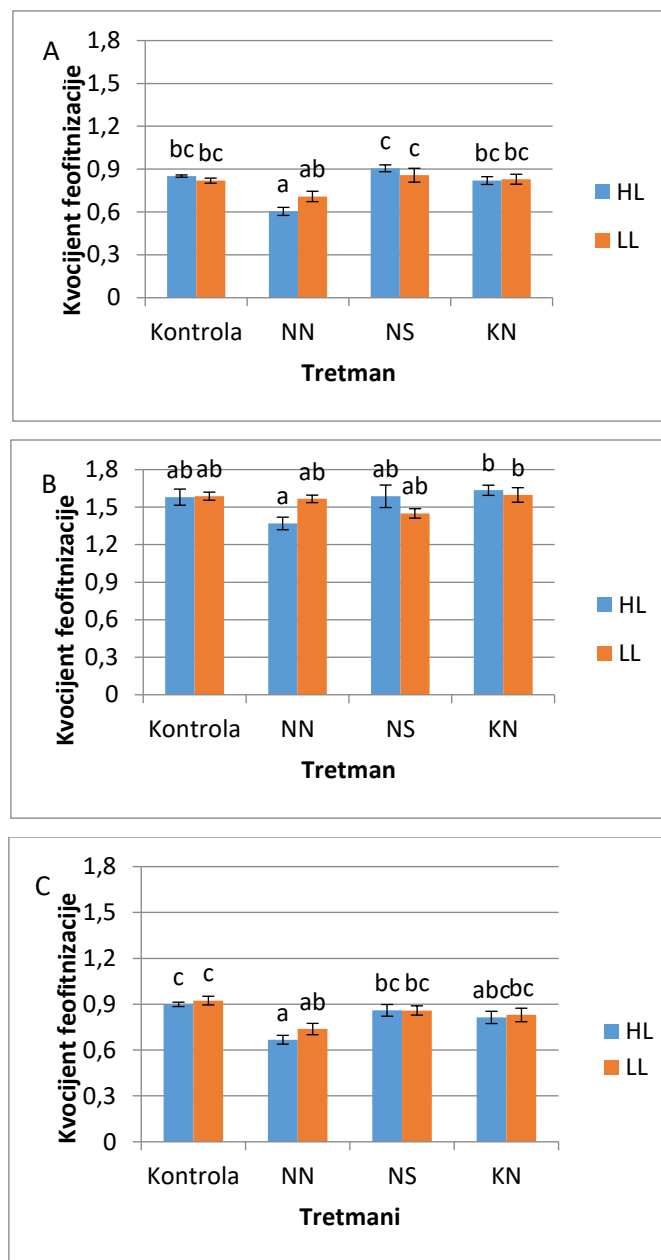
Usporedbom rezultata vidljivo je da sve tretirane grupe bez obzira na intenzitet svjetla imaju niži maseni udio karotenoida nego njihova kontrolna grupa. Za grupu tretiranu otopinom amonijeva nitrata pri svjetlu i slabijeg i jačeg intenziteta ta razlika je statistički značajna (Slika 10C). Kontrolna grupa i grupe tretirane otopinama ili amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju malo viši udio karotenoida pri svjetlu slabijeg intenziteta nego pri svjetlu jačeg intenziteta. Grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata ima imaju malo viši udio karotenoida otopinom amonijeva sulfata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata.

3.2.4. Kvocijent feofitinizacije

Među grupama koji su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najviši kvocijent feofitinizacije treći dan također ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (Slika 11A).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom kalijeva nitrata ili otopinom amonijeva nitrata imaju niži kvocijent feofitinizacije njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva sulfat ima nešto viši kvocijent feofitinizacije nego kontrolna grupa. Za grupu tretiranu otopinom amonijeva nitrata ta razlika je bila statistički značajna ($P < 0,05$) i u odnosu na kontrolu i u odnosu na ostale tretmane (Slika 11A). Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom kalijeva nitrata imaju niži kvocijent feofitinizacije nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata ima viši nego kontrolna grupa. Uočene razlike nisu statistički značajne.

Kontrolna grupa i grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata imaju viši kvocijent feofitinizacije pri svjetlu jačeg intenziteta nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Grupe tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili kalijeva nitrata imaju viši kvocijent feofitinizacije pri svjetlu slabijeg intenziteta nego pri svjetlu jačeg intenziteta. Međutim, zapažene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 11A).



Slika 11 Kvocijent feofitinizacije izražen kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna pogreška, nakon 3. (A), 7. (B) i 14. (C) dana pokusa. Tretmani: Kontrola – lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5), KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,5). HL – svjetlo jačeg intenziteta ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Rezultati nakon sedmog dana pokusa pokazuju da među grupama koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najviši kvocijent feofitinizacije ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koji su bile tretirane i izloženi svjetlu slabijeg intenziteta najviši kvocijent

feofitinizacije ima grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata (Slika 11B).

Usporedbom rezultata vidljivo je da pri svjetlu jačeg intenziteta grupe lišaja koje su bile tretirane ili otopinom kalijeva nitrata ili otopinom amonijeva sulfata imaju nešto viši kvocijent feofitinizacije nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata ima nižu vrijednost nego kontrolna grupa te značajno nižu vrijednost nego grupa koja je bila tretirana kalijevim nitratom. Pri svjetlu slabijeg intenziteta grupe tretirane ili otopinom amonijeva nitrata ili otopinom amonijeva sulfata imaju nešto niži kvocijent feofitinizacije nego njihova kontrolna grupa, dok grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata ima malo viši nego kontrolna grupa. Uočene razlike nisu bile statistički značajne. (Slika 11B). Grupe tretirane ili otopinom amonijeva sulfata ili kalijeva nitrata imaju nešto viši kvocijent feofitinizacije pri svjetlu jačeg intenziteta nego pri svjetlu slabijeg intenziteta. Grupa tretirana otopinama amonijeva nitrata ima nešto viši kvocijent feofitinizacije pri svjetlu slabijeg intenziteta nego ona pri svjetlu jačeg intenziteta. Uočene razlike nisu bile statistički značajne.

Rezultati nakon četrnaestog dana pokusa pokazuju da među grupama lišaja koje su bile tretirane i izložene svjetlu jačeg intenziteta najviši kvocijent feofitinizacije ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata. Među grupama koji su bile tretirane i izložene svjetlu slabijeg intenziteta najviši kvocijent feofitinizacije ima grupa tretirana otopinom amonijeva sulfata, a najniži grupa tretirana otopinom amonijeva nitrata (Slika 11C).

Uspoređujući rezultate vidljivo je da sve tretirane grupe imaju niži kvocijent feofitinizacije nego njihov kontrolna grupa. Za grupe koja su bila tretirane otopinom amonijeva nitrata, ta razlika je bila statistički značajna ($p \leq 0,05$). Sve grupe lišaja, osim one koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata imaju viši kvocijent feofitinizacije pri svjetlu slabijeg intenziteta nego one izložene svjetlu slabijeg intenziteta. Međutim uočene razlike nisu bile statistički značajne (Slika 11C).

4. Rasprava

Lišaji su organizmi koji se zbog svoje građe često koriste kao bioindikatori onečišćenja zraka. U mnogim istraživanjima korišteni su u praćenju emisije amonijaka i dušikovih oksida (Munzi i sur. 2009, Munzi u sur. 2010, Paolia i sur. 2010, Frati i sur. 2007). Osjetljivost lišajeva na povećanu količinu dušika ovisi od vrste do vrste te razlikujemo osjetljive acidofilne vrste i nitrofilne lišajeve koje toleriraju nešto veću količinu dušika. Upravo zbog toga što na vrste različito utječe povećana količina dušika, njihovo pojavljivanje na nekom mjestu ili izbjegavanje tog mjesta može nam puno reći o kvaliteti zraka odnosno koncentraciji onečišćivača. Učinak dušika na lišaje također ovisi o vrsti i koncentraciji spoja, vremenu izloženosti, te okolišnim faktorima kao što je intenzitet svjetla. U ovome radu istražila sam osjetljivost vrste *Flavoparmelia caperata* na povećanu razinu dušikovih spojeva. Naime za tu vrstu u literaturi nisam našla podatak pripada li acidofilnim ili nitrofilnim vrstama lišajeva pa je nejasno koliko je osjetljiva. Također zanimalo me kako utječu različiti oblici dušikovih spojeva pa sam koristila dušik u obliku amonijeva sulfata, amonijeva nitrata i kalijeva nitrata. Tako je na primjer poznato da su neke vrste kao *Hypogymnia physodes*, *Lecanora conizaeoides* i *Parmeliopsis ambigua* osobito osjetljive na amonijak dok su vrste kao *Evernia prunastri*, *Parmelia saxatilis*, *Lepraria incana* i *Hypogymnia physodes* osjetljivije na dušikove okside u zraku (Oliveira 2001). Osim utjecaja vrste dušikovitog spoja ispitala sam i utjecaj jakosti intenziteta svjetla. Poznato je da je stopa fotosinteze pri slabom intenzitetu svjetla niska, te da porastom intenziteta, do određene granice, raste stopa fotosinteze (Vidaković-Cifrek i sur. 2014). Kako je za normalnu fotosintetsku aktivnost nužan dušik, a njegove povećane količine uzrokuju oštećenja (Carter i sur. 2017), moja ideja je bila da vidim može li se izlaganjem lišajeva nešto jačem intenzitetu svjetla preusmjeriti višak dušika npr. u sintezu klorofila i tako izbjeći negativan učinak veće količine dušika. Koliko su pojedini dušikovi spojevi toksično djelovali na ovu vrstu lišaja te kako je na njihovu toksičnost utjecao intenzitet svjetlosti pratila sam mjerenjem fluorescencije klorofila *a*, udjela klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida te kvocijentom feofitinizacije.

U lišaja, život u onečišćenom okolišu često izaziva oštećenja fotosustava II. O aktivnosti fotosustava II možemo puno saznati mjerenjem fluorescencije klorofila *a*. Jedan od znakova izloženosti stresu, pa time i oštećenja fotosustava II je sniženi maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}). Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}) je u stvari omjer varijabilne fluorescencije i maksimalnog signala fluorescencije koji nam pokazuje mjeru potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II. U biljaka optimalna vrijednost QY_{max} iznosi oko 0,83 (Maxwell i Johnson 2000) dok je u lišaja vrijednost nešto manja i iznosi od 0,5-0,76 (Paoli i sur. 2010). Piccotto i sur. (2011) utvrdili su da urbano onečišćenje negativno utječe odnosno snižava vrijednosti QY_{max} u vrstama *Parmotrema*

perlatus (Huds.) M., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. i *Flavoparmelia caperata*. Do takvih rezultata došli su i Munzi i sur. (2010) koji su pratili utjecaj povećane količine dušika na vrste *Evernia prunastri* i *Xanthoria parietina*. Oni su u svome istraživanju pokazali da povećane količine dušika snižavaju maksimalni kvantni prinos fotosustava II te da utjecaj dušika na QY_max ovisi o vrsti lišaja, vremenu izloženosti i koncentraciji kojoj su izloženi. Tako su kod vrste *Evernia prunastri*, koja je poznata acidofilna vrsta, visoke koncentracije dušikovih spojeva ($c(\text{NH}_4\text{NO}_3) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$), uzrokovale sniženje vrijednosti QY_max odmah nakon prvog tretmana, a niske koncentracije ($c(\text{NH}_4\text{NO}_3) = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,025 \text{ mol dm}^{-3}$) tek nakon dužeg izlaganja. Za razliku od nje, vrsta *Xanthoria parietina* je puno tolerantnija. Visoke koncentracije navedenih spojeva utjecali su na QY_max tek nakon trećeg tretmana, dok niske koncentracije dušikovih spojeva nisu niti utjecale. U ovom radu analiza fluorescencije klorofila *a in vivo* za vrstu *Flavoparmelia caperata* pokazala je da vrsta dušikova spoja kojim su lišajevi bili tretirani i intenzitet svjetla utječu na QY_max. Tako su rezultati pokazali da je 3. i 14. dana na sniženje vrijednost QY_max, u grupa koje su bile izložene svjetlu jačeg intenziteta, značajno utjecalo tretiranje otopinom amonijeva nitrata, što se slaže s postojećim istraživanjima i ukazuje da je ova vrsta također donekle osjetljiva na dušik budući da je osjetljiva na dušik prisutan u obliku amonijeva nitrata. Dobiveni rezultati su donekle u skladu s rezultatima praćenja utjecaja dušikovih spojeva na acidofilnoj vrsti *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017). Naime i kod te vrste je jači učinak imalo tretiranje dušikom u obliku amonijeva iona. Međutim pokazalo se da je vrsta *Flavoparmelia caperata* ipak manje osjetljiva od vrste *Evernia prunastri* jer je primijećeno sniženje vrijednost QY_max bilo puno slabije izraženo. Što se tiče učinka svjetlosti tijekom trajanja pokusa, u svim grupama lišaja, QY_max je bio nešto viši pri slabijem intenzitetu svjetla nego pri jačem što nije bilo sasvim očekivano budući da pri nižim intenzitetima svjetla (koje sam ja koristila) povećanje intenziteta dovodi do poticanja stope fotosinteze. Zanimljivo je da je kao i kod vrste *E. prunastri* učinak dušikovih spojeva odnosno amonijeva nitrata bio jači pri višem intenzitetu svjetlosti. Ovi rezultati nam govore da niti kod jedne vrste hipoteza da će jače osvjetljenje potaknuti fotosintetske procese, a time posljedično i iskorištavanje „viška“ dušika iz okoliša nije potvrđena. Štoviše izgleda da je uz stres uslijed tretiranja amonijevim nitratom izlaganje jačem intenzitetu svjetlosti predstavljalo dodatni stres.

Drugi parametar koji sam pratila kako bih utvrdila fotosintetsku učinkovitost jest efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY_L). To je parametar koji također jako ovisi o uvjetima okoliša u kojem se lišaj nalazi. U uvjetima jačeg osvjetljenja ili stresnih uvjeta koji inhibiraju fotosintezu količina apsorbirane energije je prevelika u odnosu na onu koja je potrebna za fotosintezu pa dolazi do smanjenja protoka elektrona što se očituje kao sniženje

QY_L vrijednosti (Miyake i sur. 2009). Rezultati pokazuju da tijekom cijelog trajanja istraživanja na vrijednost QY_L u vrsti *F. caperata* statistički značajno nije utjecala niti vrsta spoja, a niti intenzitet svjetla. Dobiveni rezultati se značajno razlikuju od onih za vrstu *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017) gdje je faktorijalna analiza varijanci pokazala da je na QY_L značajno utjecala i vrsta dušikova spoja i intenzitete svjetla i kombinacija intenziteta svjetla i tretmana. Dušikovi spojevi, a osobito amonijevi ioni imali su izrazito negativan učinak na QY_L u vrste *E. prunastri* što potvrđuje da je ta vrsta osjetljivija odnosno da je vrsta *F. caperata* tolerantnija na povećanu količinu dušikovih spojeva pa čak i u obliku amonijeva iona. Iako intenzitet svjetla nije statistički značajno utjecao na QY_L uočene su nešto više vrijednosti QY_L pri slabijem intenzitetu. Ovi rezultati se podudaraju s rezultatima za vrstu *E. prunastri* (Čavarušić 2017). Kao što sam već spomenula za vrijednosti dobivene za QY_max ovi rezultati su malo neuobičajeni. Međutim obje vrste lišajeva su bile aklimatizirane u istoj klima-komori na intenzitetu svjetlosti od $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ što je dosta niski intenzitet svjetla pa je moguće da se fotosintetski aparat tome prilagodio. Stoga je izlaganje nešto višem intenzitetu svjetlosti možda predstavljalo stres za lišajeve što je dovelo do sniženja fotosintetske učinkovitosti uslijed nemogućnosti iskorištavanja viška energije.

Rezultati analize pokazuju da tijekom trajanja istraživanja na koeficijent fotokemijskog gašenja (QP) u vrsti *F. caperata* statistički značajno nije utjecala niti vrsta spoja, a niti intenzitet svjetla. QP odražava redoks-stanje primarnog akceptora elektrona fotosustava II (plastokinona) te je pokazatelj oksidiranih reakcijskih centara na fotosustavu II (Maxwell i Johnson, 2000). Dobiveni rezultati ukazuju da u vrsti *F. caperata* dušikovi spojevi ne utječu na protok elektrona te ne smanjuju učinkovitost fotosintetskih procesa što se slaže s rezultatima dobivenim za maksimalni i efektivni prinos fluorescencije. Ti se rezultati značajno razlikuju od onih za vrstu *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017) gdje je faktorijalna analiza varijanci pokazala da je na QP značajno utjecala i vrsta dušikova spoja i kombinacija intenziteta svjetla i tretmana. Naime svi dušikovi spojevi osim kalijevog nitrata smanjili su QP što ukazuje da je manje otvorenih PSII centara, odnosno da su reducirani i potvrđuje da je došlo do zastoja u prijenosu elektrona koji se ne prenose do NADP⁺ (Čavarušić 2017). Ovdje je zanimljivo primijetiti da iako nije bilo značajno, najnižu vrijednost u mom istraživanju bez obzira na intenzitet svjetla, tijekom cijelog istraživanja imala grupa koja je bila tretirana otopinom kalijeva nitrata što je suprotno od rezultata dobivenih u radu Čavarušić (2017) gdje je tretman kalijevim nitratom, pri svjetlu slabijeg intenziteta uzrokovao povišenje QP 14. dan.

Jedan od znakova da su lišaji pod stresom je povećanje nefotokemijskog gašenja fluorescencije (NPQ). U takvim uvjetima apsorbirana energija se ne koristi za reakcije fotosinteze već se oslobađa u obliku topline (Vidaković–Cifrek i sur. 2014). Rezultati mojeg istraživanja pokazuju da na vrijednost NPQ u vrsti *F. caperata* statistički značajno nije

utjecala niti vrsta spoja, a niti intenzitet svjetla. Kako kod ove vrste lišajeva nije došlo do negativnih učinaka na fotosintetsku učinkovitost očekivala sam će NPQ vrijednosti biti slične kontrolnim. Međutim, možemo ipak primijetiti da je na NPQ vrijednosti utjecalo vrijeme izloženosti jer je 14. dana zabilježen pad vrijednosti NPQ u svih tretiranih grupa u odnosu na 3. i 7. dan. Također, rezultati analize pokazali su da je najnižu vrijednost NPQ, pri svjetlu jačeg intenziteta, imala grupa tretirana otopinom kalijeva nitrata. Sniženje vrijednosti NPQ primijetila je i Čavarušić (2017) u svojem radu na vrsti *Evernia prunastri* što je donekle neočekivani rezultat jer bi bilo za očekivati sa se uslijed stresa dušikom dio energije koja nije iskorištena u fotosintezi oslobodi putem topline što bi rezultiralo povećanjem vrijednosti NPQ (Maxwell i Johnson 2000). Piccotto i sur. (2011) su dobili slične rezultate u vrsta *F. caperata* i *Parmotrema perlatum* koje su se nalazile uz cestu u gradovima Trieste i Udine (Italija) Iako su zabilježili pad vrijednosti već na polovici vremena trajanja pokusa, značajno sniženje NPQ je bilo tek na kraju pokusa. Prema Piccotto i sur. (2011) dušikovi oksidi uzrokuju acidifikaciju citoplazme što može smanjiti trans-tilakoidni protonski gradijent koji je povezan s NPQ-om. Isto tako zakiseljavanje smanjuje aktivnost enzima nitrat reduktaze što može dovesti do ulaženja i taloženja nitrata u stanice i time utjecati na fotosintetsku aktivnost. Međutim, u mojem istraživanju je do smanjenja NPQ 14. dan u odnosu na 3. i 7. dan došlo i kod lišajeva tretiranih vodom (kontrolnih) što ukazuje da je to vjerojatno posljedica uvjeta u klima-komori koji možda nisu bili optimalni za ovu vrstu.

U mnogim istraživanjima se biomonitoring pomoću lišaja proveo praćenjem promjena fizioloških parametara kao što su koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih karotenoida te kvocijenta feofitinizacije (Sujetovienė 2013, Frati i sur. 2006, Bačkor i sur. 2003). Istraživanja su pokazala da zagađivači zraka, amonijak i dušikovi oksidi uzrokuju promjene u navedenim parametrima. Na udio fotosintetskih pigmenata utječe i intenzitet svjetla. Pri svjetlu slabijeg intenziteta povećan je udio klorofila *a* i *b*, a smanjen udio karotenoida (Franc i sur. 2007).

Na maseni udio klorofila *a* u tkivu lišaja *Flavoparmelia caperata* utjecala je vrsta dušikova spoja. Već nakon 3. dana bilježi se statističko značajno sniženje u grupi lišaja koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata i izložena svjetlu jačeg intenziteta u odnosu na kontrolnu grupu. Ova grupa lišaja imala je tijekom cijelog istraživanja najniži udio klorofila *a*. U ostalim tretiranim grupama najveća razlika vidljiva je 14. dana kada sve tretirane grupe imaju niži udio klorofila *a* nego kontrolne grupe. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima za vrstu *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017) gdje je tretman amonijevim nitratom također imao najnegativniji učinak. Ovi rezultati također potvrđuju tezu da vrijeme izloženosti dušikovim spojevima također utječe na toksičnost ovih spojeva. Što je vrijeme izloženosti duže to je jači utjecaj dušikovitih spojeva (Munzi i sur. 2010). U početku, povećana količina dušika iz spojeva može djelovati kao nutrijent što je uzrokovalo blagi porast udjela klorofila *a*

7. dan kod većine tretmana osim kod amonijeva nitrata. No, dugotrajna izloženost povećanoj količini dušika izaziva određene posljedice kao što je zakiseljavanje što može uzrokovati degradaciju klorofila *a*, što se očituje u sniženju udjela 14. dan. Slični su rezultati zabilježeni u vrste *Ramalina farinacea* (Sujetovienė 2013) koja je nakon što je bila premještena s mjesta manjeg zagađenja na mjesto jačeg zagađenja u gradu Kaunas (Litva), na početku bilježila rast u udjelu klorofila *a*, a nakon mjesec dana značajan pad.

Rezultati ovog istraživanja su također pokazali da intenzitet svjetla utječe na količinu pigmenata jer je uglavnom, osim kod tretmana amonijevim nitratom, zabilježen nešto veći udio klorofila *a* pri jačem intenzitetu svjetla i kod tretiranih i kod netretiranih lišajeva što nije bilo očekivano. Ovo se možda može objasniti time da je za ovu vrstu optimalan rast pri nešto većim intenzitetima svjetlosti pa je povećanje intenziteta stimuliralo sintezu klorofila pri jačem intenzitetu svjetla. Piccotto i Tretiach (2010) su u svom istraživanju pokazali da lišajevi sa sunčanih staništa imaju više klorofila nego oni sa sjenovitih. Međutim moji rezultati dosta variraju čak i u kontroli pa je moguće da još neki uvjeti utječu na ovaj parametar. Kod vrste *Evernia prunastri* dobiveni su suprotni rezultati odnosno veći udio klorofila uočen je kod nekih uzoraka pri slabijem intenzitetu svjetlosti (Čavarušić 2017) što potvrđuje da se ove dvije vrste dosta razlikuju u fiziologiji.

Na maseni udio klorofila *b* značajno je utjecala vrsta dušikova spoja tek nakon 14. dana kada grupa lišaja koji su bili tretirani otopinom amonijeva nitrata i izloženi svjetlu jačeg intenziteta pokazuju značajni pad u odnosu na kontrolnu grupu. Upravo je ta grupa lišaja imala tijekom cijelog istraživanja najniži udio klorofila *b*. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima za klorofil *a* pa možemo zaključiti da amonijev nitrat najviše utječe na sastav klorofila što potvrđuju i rezultati za vrstu *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017) gdje je također zabilježen najniži udio klorofila u grupi koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata. U ovom istraživanju uočila sam i neke manje razlike unutar istog tretmana pri različitom intenzitetu svjetla. Tako je 14. dana u svih grupa osim one koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata, zabilježen veći udio klorofila *b* pri slabijem intenzitetu svjetla nego pri jačem što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima gdje je pokazano da je pri slabijem intenzitetu svjetla veći udio klorofila. Čudno je to što je u kontrolnoj grupi i grupi lišaja koja je bila tretirana otopinom amonijeva sulfata udio klorofila *b*, 3. i 7. dana viši pri jačem intenzitetu svjetla. Kao što sam već spomenula kod klorofila *a* moguće da još neki uvjeti utječu na udio klorofila u tkivu.

Na udio ukupnih karotenoida također je utjecalo tretiranje dušikovim spojevima. Već nakon 3. dana pokusa zabilježen je značajan pad udjela ukupnih karotenoida u grupi lišaja koja je bila tretirana amonijevim nitratom i izložena svjetlu jačeg intenziteta. Upravo grupe

lišaja koja su bile tretirane otopinom amonijeva nitrata imaju i najniži udio karotenoida. Ovi rezultati su slični onima u vrsti *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017) gdje je isto najmanji udio karotenoida pronađen u grupi lišaja koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata. Također smanjenje udjela karotenoida lišajeva nakon tretmana dušikovim spojevima, uočili su i Frati i sur. (2005) što ukazuje da dušikovi spojevi imaju negativan učinak na sve fotosintetske pigmente. Iako intenzitet svjetla nije statistički značajno utjecao na rezultate, zabilježena je manja razlika u udjelu karotenoida pri različitim intenzitetu svjetla. Tako je pri svjetlu jačeg intenziteta udio karotenoida kod nekih uzoraka bio viši nego pri svjetlu slabijeg intenziteta. Dobiveni rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima u kojima je pokazano da je pri jačem intenzitetu svjetla povišen udio karotenoida (Franck i sur. 2007) koji služe kao zaštitni pigmenti. Međutim rezultati su različiti od onih dobivenih za vrstu *Evernia prunastri* (Čavarušić 2017) pa je moguće da kod te vrste važnu ulogu u obrani od viška svjetlosti ima sama gljiva koja štiti fotobionta te različiti sekundarni metaboliti (Piccotto i Tretiach 2010).

Jedan od često korištenih znakova vitalnosti lišaja je degradacija fotosintetskih pigmenata koja se mjeri kvocijentom feofitinizacije. Neki autori pronašli su direktnu vezu između stupnja degradacije klorofila *a* i onečišćivača okoliša (Munzi i sur. 2009). Povećane količine dušika, u obliku amonijevih iona i dušikovitih oksida dovode do zakiseljavanja što uzrokuje micanje središnjeg magnezijevog iona iz molekule klorofila i time pretvorbu klorofila *a*, fotosintetskog pigmenta u feofitin, nefotokemijski pigment (Carter i sur. 2017). Rezultati mog mog istraživanja pokazuju da je na vrijednost kvocijenta feofitinizacije utjecala vrsta dušikova spoja. Najniže vrijednosti u sva tri dana mjerenja ima grupa koja je bila tretirana amonijevim nitratom i izložena svjetlu jačeg intenziteta. Ovi rezultati su u skladu s onima za klorofila *a* i *b* te potvrđuju da dušik u obliku amonijeva nitrata uzrokuje degradaciju klorofila i da je najtoksičniji za vrstu *F. caperata*. Analiza pokazuje da je 7. dan došlo do povišenja kvocijenta feofitinizacije u svih grupa, kako u tretiranih tako i u kontrolnih. Ovi rezultati se malo razlikuju od onih za vrstu *Evernia prunastri* gdje su vrijednosti kvocijenta feofitinizacije 7. dan ostale podjednake onima iz 3. dana u svih grupa, osim u kontrolne izložene svjetlu slabijeg intenziteta i grupe koja je bila tretirana otopinom amonijeva nitrata i izložena svjetlu jačeg intenziteta (Čavarušić 2017). Gledajući rezultate vidljivo je da svi rezultati pigmenata za 7. dan dosta iskaču od onih za 3. i 14. dan. Mogući razlog tim odskakanjima je da je tu došlo do pogreške tijekom mjerenja ili ekstrakcije.

Dušik u obliku amonijeva nitrata pokazao se kao najtoksičniji čemu sigurno pridonose amonijevi ioni ali i ukupno veća količina dušika budući da su uz amonijeve ione prisutni i nitratni ioni. Rezultati dobiveni za udio klorofila poklapaju se s rezultatima koje sam utvrdila za maksimalni kvantni prinos fluorescencije budući da amonijev nitrat smanjuje oboje što ukazuje da u ove vrste upravo amonijev nitrat oštećuje fotosintetski aparat odnosno dovodi

do degradacije klorofila i oštećenja fotosustava II pa time i smanjene fotosintetske učinkovitosti.

U ovome istraživanju fotosintetski pigmenti pokazali su se kao nešto osjetljiviji pokazatelj učinka povećane količine dušika na ovu vrstu. Tretman amonijevim nitratom je uzrokovao sniženje udjela svih pigmenata, a čak je i tretman amonijevim sulfatom snizio udio klorofila b 14. dan nakon pokusa dok je kod fluorescencijskih parametara učinak primijećen samo kod amonijeva nitrata i to samo na vrijednosti QY_{max} i NPQ, dok na vrijednosti QY_L i QP nije značajno utjecao.

Iz svih rezultata može se zaključiti da je lišaj *F. caperata* ipak donekle osjetljiv na dušikove spojeve osobito u obliku amonijeva nitrata što je vjerojatno posljedica nakupljanja dušika u tkivu lišaja što dovodi do zakiseljavanja i degradacije klorofila te posljedično smanjuje fotosintetsku učinkovitost i smanjuje količinu ugljikohidrata za sintezu aminokiselina koje se mogu koristiti za asimilaciju toksičnog amonijaka. Veća toksičnost amonijeva nitrata u odnosu na kalijev nitrat može se objasniti s činjenicom da lišajevi lakše uzimaju amonijeve ione (NH₄⁺) nego negativno nabijene oblike dušika kao što je nitrat, a slobodan amonijak, ako se brzo ne veže u aminokiseline je toksičan i može narušiti protonski gradijent važan za nastanak ATP (Munzi i sur. 2012). U prilog osjetljivosti lišaja *F. caperata* na dušik ide i rezultat da jači intenzitet svjetlosti nije smanjio štetan učinak dušika. Naime, povećanje koncentracije klorofila kao odgovor na povećanja koncentracije dušikovih spojeva u okolišu, što za posljedicu ima povećanje fotosintetskog kapaciteta nužno potrebnog za stvaranje ugljikovih kostura aminokiselina koji onda mogu vezati višak dušika, opaženo je samo u tolerantnih vrsta lišajeva (Hauk i sur. 2010 prema Munzi i sur. 2013).

5. Zaključak

- Tretiranje lišaja *Flavoparmelia caperata* otopinom amonijeva nitrata uzrokovalo je sniženje vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava (QY_{max}) dok tretiranje ostalim dušikovim spojevima nije imalo značajnog učinka. Tretiranje dušikovim spojevima nije značajno utjecalo na efektivni kvantni prinos fotosustava II kao niti na koeficijent fotokemijskog gašenja bez obzira na intenzitet osvjettljenja.
- Niti tretman dušikovim spojevima niti intenzitet svjetla nisu značajno utjecali na vrijednost nefotokemijskog gašenja fluorescencije (NPQ).
- Povećana količina dušika, u obliku amonijeva nitrata, snizila je u lišaja udio klorofila *a*, *b* te ukupnih karotenoida osobito 14. dana nakon tretmana.
- Povećana količina dušika, u obliku amonijeva nitrata, uzrokovala je degradaciju klorofila *a* što se očituje u snižavanju vrijednosti kvocijenta feofitinizacije. Intenzitet svjetla nije značajno utjecao na kvocijent feofitinizacije.
- Vrsta *F. caperata* je osjetljiva na povećanu količinu dušika u obliku amonijeva nitrata.
- Intenzitet svjetla nije utjecao na učinak dušikovitih spojeva. Jači intenzitet svjetlosti nije smanjio štetan učinak dušika.

6. Literatura

- Bačkor M., Paulíková K., Geralská A., Davidson R. (2003). Monitoring of air pollution in Košice (Eastern Slovakia) using lichens. *Polish Journal of Environmental Studies* 2, 141-150.
- Carter, T. S., Clark C. M., Fenn M. E., Jovan S., Perakis S. S., Riddell J., Schaberg P.G., Greaver T.L., Hastings M. G. (2017). Mechanisms of nitrogen deposition effects on temperate forest lichens and trees. *Ecosphere* 8(3), e01717.
- Conti M. E., Cecchetti G. (2001). Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment- review. *Environmental Pollution* 141, 471-492.
- Čavarušić B. (2017). Učinak dušika na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišaja *Evernia prunastri*. Diplomski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb.
- Čuček M. (2017). Učinak olova na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišajeva *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale i *Evernia prunastri* (L.) Ach. Diplomski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet
- Evans, J. R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78, 9-19.
- Franck N., Winkler S., Pastenes C., Infante R. (2007). Acclimation to sun and shade of three accessions of the Chilean native berry-crop murta. *Agroforest Systems* 69, 215–229.
- Fрати L., Caprasecca E., Santoni S., Gaggi C., Guttova A., Gudino S., Pati A., Rosamilia S., Pirintsos S. A., Loppi S. (2006). Effects of NO₂ and NH₃ from road traffic on epiphytic lichens. *Environmental Pollution* 142, 58-64.
- Fрати L., Santoni S., Nicolardi V., Gaggi C., Brunialti G., Guttova A., Gaudino S., Pati A., Pirintsos S. A., Loppi S. (2007). Lichen biomonitoring of ammonia emission and nitrogen deposition around a pig stockfarm. *Environmental Pollution* 146, 311-316.
- Lackovičova A., Guttova A., Bačkor M., Pišut P., Pišut M. (2013). Response of *Evernia prunastri* to urban environmental conditions in Central Europe after the decrease of air pollution. *The Lichenologist* 45, 89–100.
- Lange O. L., Allan Green T. G., Heber U. (2010). Hydration - dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance?. *Journal of Experimental Botany* 363, 2033 - 2042

Larsen R. S., Bell J. N. B., James P. W., Chimonides P. J., Rumsey F. J., Tremper A., Purwis O. W. (2007). Lichen and bryophyte distribution on oak in London in relation to air pollution and bark acidity. *Environmental Pollution* 2, 332 – 340.

Maslaňáková I., Biřová I., Goga M., Kuchár M., Bačkor M. (2015). differences between sensitivity of mycobiont and photobiont of *cladonia* sp. lichens to different types of nitrogen exposure. *water, Air, Soil Pollution*, 226 – 243.

Maslać A. (2016). Učinak kadmija na fotosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita u lišajeva *Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri* i *Flavoparmelia caperata*. Diplomski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb.

Maxwell K., Johnson G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 345, 659-668.

Miyake C., Amako K., Shiraishi N., Sugimoto T. (2009). Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system — relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of Chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. *Plant Cell Physiology*. 50(4): 730–743.

Munzi S., Loppi S., Pirintsos S. A. (2009). Chlorophyll degradation and inhibition of polyamine biosynthesis in the lichen *Xanthoria parietina* under nitrogen stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 281-285.

Munzi S., Pisani T., Paoli L., Renzi M., Loppi S (2013). Effect of nitrogen supply on the C/N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Turkish Journal of Biology* 37,165-170.

Munzi S., Paoli L., Fiorini E., Loppi S. (2012). Physiological responses of the epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach to ecologically relevant nitrogen concentrations. *Environmental Pollution* 171, 25-29.

Munzi S., Pisani T., Paoli L., Renzi M., Loppi S. (2010). Time- and dose- dependency of the effects of nitrogen pollution on lichens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1785-1788

Munzi S., Pisani T., Loppi S.(2009). The integrity of lichen cell membrane as suitable parameter for monitoring biological effects of acute nitrogen pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 2009-2012.

Nash III TH, 2008. Lichen biology, second edition, Cambridge University Press, Cambridge.

Nimis P. W., Scheidegger C., Wolseley P. A. (2000). Monitoring with lichens – Monitoring lichens. Kluwer Academic Publishers, West Wales.

Oliveira G. G., Branquinho C., Maguas C., Loucao M. A. M., (2001). The concentration of nitrogen in nitrophilous and non – nitrophilous lichen species. *Symbiosis* 31, 187 – 199.

Paoli L., Benesperi R., Proietti Pannunzi D., Corsini A, Loppi S. (2014). Biological effects of ammonia released from a composting plant assessed with lichens. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 5861–5872.

Paolia L., Pirintsosb S.A., Kotzabasisb K., Pisania T., Navakoudisb E., Loppi S. (2010). Effects of ammonia from livestock farming on lichen photosynthesis. *Environmental Pollution* 158, 2258-2265.

Piccotto M., Tretiach M. (2010). Photosynthesis in chlorolichens: the influence of the habitat light regime. *Journal of Plant Research* 123, 763–775.

Pevalek-Kozlina B, 2003. Fiziologija bilja, Profil international, Zagreb.

Riddell J., Padgett P. E., Nah T. H. (2012). Physiological responses of lichens to factorial fumigations with nitric acid and ozone. *Environmental Pollution* 170, 202 – 210.

Spier L., Dobben van H., Dort van K. (2010). Is bark pH more important than tree species in determining the composition nitrophytic or acidophytic lichen floras. *Environmental Pollution* 158, 3607-3611.

Sujetovienė G. (2013). Biomonitoring of urban air quality in Kaunas City (Lithuania) using transplanted lichens. *Biologija* 2, 157-164

Sun J., Ye M., Peng S. I Li Y. (2016). Nitrogen can improve the rapid response of photosynthesis to changing irradiance in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Scientific Reports* 6:31305

Vos, J., Van der Putten, P. E. L., Birch, C. J. (2005). Effect of nitrogen supply on leaf appearance, leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in maize (*Zea mays* L.). *Field Crops Research* 93, 64-73.

Vidaković-Cifrek Ž., Pevalek- Kozlina B., Tkalec M., Babić M., Radić Brkanac S., 2014. Praktikum iz fiziologija bilja, skripta za internu upotrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb

<http://www.buffelskloof.info/Lichens.htm>

http://www.lichens.lastdragon.org/Flavoparmelia_caperata.html

7.Životopis

Ime i prezime: Marina Smetiško

Datum i mjesto rođenja: 28.10.1993, Vinkovci

Obrazovanje:

2000.- 2008	Osnovan škola Matije Gupca, Jarmina
2008.- 2012.	Gimnazija Matija Antun Reljković, Vinkovci
2012.- 2017.	Preddiplomski studij biologije, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek

Dodatne informacije:

- Višegodišnje sudjelovanje u manifestaciji „Noć biologije“
- Članica Udruge studenata biologije- BIUS, Sekcija za lišajeve